

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

TESE

Avaliação do perfil metabólico de *Subulina octona* Brugüière, 1789
(Gastropoda, Subulinidae) experimentalmente infectada por
Paratanaisia bragai (Santos, 1934) (Digenea, Eucotylidae)

Tatiane Cristina dos Santos Bonfim
2020



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

**AVALIAÇÃO DO PERFIL METABÓLICO DE *SUBULINA*
OCTONA BRUGUIÈRE, 1789 (GASTROPODA, SUBULINIDAE)
EXPERIMENTALMENTE INFECTADA POR *PARATANAISIA*
BRAGAI (SANTOS, 1934) (DIGENEA, EUCOTYLIDAE)**

TATIANE CRISTINA DOS SANTOS BONFIM

Sob a Orientação do Professor:
Jairo Pinheiro da Silva, UFRRJ

e Co-orientação
Prof^a Solange V. P. B. Brandolini, UFRRJ
Dr. Vinícius Menezes Tunholi Alves, UFRRJ

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de Doutora em
Ciências, no Curso de Pós-Graduação
em Ciências Veterinárias.

**Seropédica
Fevereiro de 2020**

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

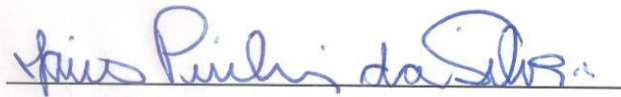
- B713a Bonfim, Tatiane Cristina dos Santos , 1991-
Avaliação do perfil metabólico de *Subulina octona*
Brugüiere, 1789 (Gastropoda, Subulinidae)
experimentalmente infectada por *Paratanaisia bragai*
(Santos, 1934) (Digenea, Eucotylidae) / Tatiane
Cristina dos Santos Bonfim. - Rio de Janeiro, 2020.
151 f.: il.
- Orientador: Jairo Pinheiro da Silva.
Coorientadora: Solange Viana Paschoal Blanco
Brandolini.
Coorientador: Vinícius Menezes Tunholi Alves.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Curso de Pós Graduação em Ciências
Veterinárias, 2020.
1. Parasitologia. 2. Molusco terrestre. 3.
Fisiologia comparada. 4. Relação parasito-hospedeiro.
5. Malacologia Veterinária. I. Pinheiro da Silva,
Jairo , 1969-, orient. II. Viana Paschoal Blanco
Brandolini, Solange , 1966-, coorient. III. Menezes
Tunholi Alves, Vinícius, 1983-, coorient. IV
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso
de Pós Graduação em Ciências Veterinárias. V. Título.

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

TATIANE CRISTINA DOS SANTOS BONFIM

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Ciências**, no
Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias,

TESE APROVADA EM 28 /02/2020

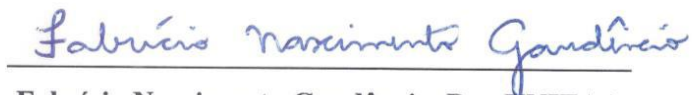


Jairo Pinheiro da Silva. Dr., UFRRJ

(Orientador)



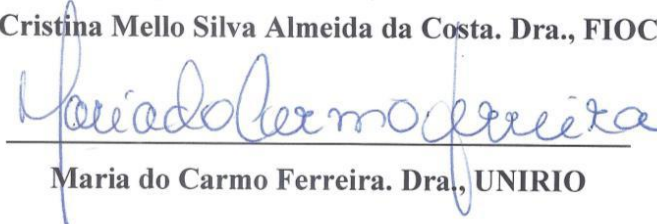
Vanessa Barreto Xavier. Dra., UFRRJ



Fabrício Nascimento Gaudêncio. Dr., UNIFAA



Clélia Cristina Mello Silva Almeida da Costa. Dra., FIOCRUZ



Maria do Carmo Ferreira. Dra., UNIRIO

*“Na vida, não existe nada a se temer, apenas a ser compreendido.
Agora é o momento de entender mais para que possamos temer menos”.*

Marie Skłodowska Curie

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida, pelas oportunidades concedidas e pela resiliência para realizar essa caminhada.

Aos meus pais, Nádia Cristina Bonfim e Sileno Bonfim, que foram meu porto seguro, agradeço pela compreensão, ajuda, carinho e força para que eu pudesse alcançar os meus objetivos.

À minha irmã Caroline Cristina Bonfin e a sua filha Maya Cristina, pela ajuda, momentos de alegria e carinho.

Ao meu esposo, Carlos Henrique Silva, pelo incentivo e paciência, pelas palavras de carinho e apoio, por todos os dias de espera no laboratório e nas aulas e por tudo o que vivemos.

Ao meu orientador professor Dr. Jairo Pinheiro, Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ pelos ensinamentos, paciência e confiança depositada em mim e no meu trabalho. Agradeço imensamente pelo acolhimento em momentos difíceis.

À grande amiga e madrinha Dra. Florence Gonçalves Martins, Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ pela enorme ajuda, orientação e companhia. Por me acalmar nos momentos de desespero, me fazer rir das tragédias e estar ao meu lado nessa jornada. Agradeço também aos seus familiares, Mauro Sergio, Thiago Martins e Pedro Martins pela paciência e por dividirem a atenção da Florence comigo.

Aos meus co-orientadores Professora Dra. Solange Viana Paschoal Blanco Brandolini, Departamento de Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, pelos ensinamentos e por transmitir tanta tranquilidade e ao Dr. Vinícius Menezes Tunholi-Alves, Universidade Estácio de Sá, Campus Vargem Grande, RJ, pela ajuda.

Aos colaboradores Professor Dr. Marcos Antonio José dos Santos Departamento de Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, Professora Dra. Rosane Nora Castro, Departamento de Química

Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, Professora Dra. Patrícia da Silva Golo, Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ e Técnico de laboratório Adonis Rodrigues de Lima, Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, CPGCV/UFRRJ, pelos ensinamentos e aos colegas do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, CPGCV/UFRRJ, pelos momentos de descontração, pelas caronas e pela troca de experiências.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 (Portaria CAPES/MEC nº 206, de 4 de setembro de 2018).

Agradeço a todos que direta ou indiretamente colaboraram para a elaboração dessa tese e por fazer de mim uma pessoa melhor.

BIOGRAFIA

Tatiane Cristina dos Santos Bonfim, filha de Sileno dos Santos Bonfim e Nádia Cristina dos Santos Bonfim, nascida em 10 de junho de 1991 no Município do Rio de Janeiro, RJ.

Concluiu em 2005 o ensino fundamental na Escola Municipal Presidente Eurico Dutra, Rio de Janeiro, RJ. Em 2006 ingressou na Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio, Fiocruz, RJ, concluindo em 2008 o Ensino Médio Integrado ao Técnico de Laboratório de Bodiagnóstico em Saúde. Passando por um estágio obrigatório no Laboratório de Ultra-Estrutura Viral do Departamento de Virologia do IOC (Instituto Oswaldo Cruz) – FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz).

Cursou a graduação em Ciências Biológicas, modalidade Licenciatura, da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO), sendo monitora da disciplina de Química Orgânica, Departamento de Ciências Naturais, IBIO. Adicionalmente, foi bolsista do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC)/CNPq/FIOCRUZ, RJ, trabalhando no estudo da interface *Angiostrongylus cantonensis*/*Echinostoma paraensei*/*Biomphalaria glabrata*, sob orientação do Dr. Arnaldo Maldonado Junior. Graduou-se em Ciências Biológicas em novembro de 2013.

Em março de 2014, ingressou no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – nível mestrado, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) sob orientação do Professor Dr. Jairo Pinheiro da Silva e co-orientação do Dr. Juberlan Santos Garcia - FIOCRUZ, sendo bolsista CNPq. O título de Mestre em Ciências foi obtido no ano de 2016.

Ingressou, em 2016, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – nível Doutorado, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro sobre orientação do Professor Jairo Pinheiro da Silva e co-orientação da Professora Dra. Solange Viana P. B. Brandolini, UFRRJ e Prof. Dr. Vinícius Menezes Tunholi Alves, UNESA, sendo bolsista CAPES.

RESUMO GERAL

BONFIM, Tatiane Cristina dos Santos. **Avaliação do perfil metabólico de *Subulina octona* Bruguière, 1789 (Gastropoda, Subulinidae) experimentalmente infectada por *Paratanaisia bragai* (Santos, 1934) (Digenea, Eucotylidae).** 2020. 151 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

Subulina octona e *Leptinaria unilamellata* são hospedeiros intermediários de *Paratanaisia bragai*. O objetivo foi descrever os efeitos da infecção experimental por *P. bragai* em *S. octona* sobre os aspectos reprodutivos; metabolismo de carboidratos; proteínas e produtos nitrogenados e cálcio. Formou-se 4 grupos com moluscos infectados e 4 grupos com moluscos controle. A cada 10 dias, os parâmetros selecionados foram avaliados. Comparando os moluscos infectados com o controle, observou-se a redução nos parâmetros reprodutivos analisados; aumento na glicemia; padrão oscilatório no conteúdo de glicogênio e atividade de LDH, reduções significativas e progressivas nas concentrações dos ácidos orgânicos, exceto o ácido láctico; hiperproteinemia; aumento na concentração de ureia; ácido úrico e atividade de ALT, menor crescimento percentual e menor quantidade de cálcio na concha e alterações nos tecidos analisados pela histologia e histoquímica. Em relação à reprodução, foi observada a castração parasitária parcial indireta pela inibição da gametogênese ou a viabilidade dos gametas femininos. No metabolismo de carboidratos viu-se que os moluscos infectados não utilizaram significativamente as reservas glicídicas apesar do aumento da glicemia, indicando que o metabolismo passou para um padrão predominantemente anaeróbio. As análises histológicas mostram intensa degradação dos tecidos observados (gonadal, glândula digestiva e massa cefalopediosa) causando extravasamento de proteínas para a hemolinfa, aumento de ALT e AST e alteração da via metabólica, que usa proteínas como substrato energético. Na tentativa de compensar alterações de pH, o cálcio é mobilizado da concha e disponibilizado para manter a homeostase.

Palavras-chave: biologia reprodutiva, perfil metabólico, relação parasito-hospedeiro.

ABSTRACT

BONFIM, Tatiane Cristina dos Santos. **Avaliação do perfil metabólico de *Subulina octona* Bruguière, 1789 (Gastropoda, Subulinidae) experimentalmente infectada por *Paratanaisia bragai* (Santos, 1934) (Digenea, Eucotylidae).** 2020. 151 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

Subulina octona and *Leptinaria unilamellata* are intermediate hosts of *Paratanaisia bragai*. The objective was to describe the effects of experimental infection by *P. bragai* in *S. octona* on reproductive aspects; carbohydrate metabolism; proteins and nitrogenous products metabolism and calcium metabolism. Four groups were formed with infected snails and 4 groups with control snails. Every 10 days, the selected parameters were evaluated. Comparing the infected molluscs with the control, was observed a reduction in the reproductive parameters analyzed; increase in glucose content; oscillatory pattern in glycogen content and LDH activity, significant and progressive reductions in organic acid concentrations, except lactic acid; hyperproteinemia; increase in urea concentration; uric acid concentration and ALT activity, lower percentage growth and lower amount of calcium in the shell and changes in tissues analyzed through histology and histochemistry. Regarding reproduction, indirect partial parasitic castration was observed by inhibiting gametogenesis or the viability of female gametes. In carbohydrate metabolism, it was seen that the infected molluscs did not significantly use the glycidic reserves despite the increase in glycemia, indicating that the metabolism changed to a predominantly anaerobic pattern. Histological analyzes show intense degradation of the observed tissues (gonadal, digestive gland and cephalopedal mass) causing extravasation of proteins into the hemolymph, increase in ALT and AST and alteration of the metabolic pathway, which uses proteins as an energy substrate. In an attempt to compensate for pH changes, calcium is mobilized from the shell and made available to maintain homeostasis.

Keywords: reproductive biology, metabolic profile, host-parasite relationship.

LISTA DE FIGURAS

2 REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1: *Paratanaisia bragai*. A) Adultos pós-ovígeros. os: ventosa oral; ph: faringe; u: útero; sr: receptáculo seminal; o: ovário; t: testículo; vg: glândula vitelina; ic: ceco intestinal. Barra: 200µm. Fonte: D’Avila et al. (2017). B) Espécime de *Paratanaisia bragai*, recuperado do rim de *Meleagris gallopavo* e processado. Barra: 0.2 mm. Fonte: Brener et al. (2006). C) Ventosa oral de adultos pré-ovígeros. Barra: 50µm. Fonte: D’Avila et al. (2017). D) Ventosa oral dos adultos pós-ovígeros. Barra: 150µm. Fonte: D’Avila et al. (2017).

Figura 2: Ciclo biológico de *Paratanaisia bragai*. Fonte: Xavier (2015). 13

Figura 3: Distribuição de *Paratanaisia bragai*. Fonte: Xavier (2015). 16

Figura 4: Hospedeiros definitivos de *Paratanaisia bragai* descritos na literatura. A) *Columba livia*^a; B) *Columbina talpacoti*^b; C) *Gallus gallus domesticus*^c; D) *Numida meleagris*^d; E) *Meleagris gallopavo*^e; F) *Phasianus colchicus*^f; G) *Ara ararauna*^g; H) *Propyrrhura maracana*^h; I) *Pyrrhura leucotis*ⁱ; J) *Rhynchotus rufescens*^j; K) *Lybius bidentatus*^k; L) *Estrilda astrild*^l. 17

Figura 5: Espécimes de *Subulina octona*. Fonte: Autora. 20

Figura 6: Distribuição geográfica de *Subulina octona*. Os pontos amarelos indicam os locais com registro do molusco. Fonte: Discover Life - <https://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Subulina+octona> 23

Figura 7: Mapa metabólico de *Subulina octona* com a indicação dos parâmetros analisados no presente estudo (em amarelo). Fonte: Autora. 30

3 METODOLOGIA GERAL

Figura 1: Esquema para a obtenção dos moluscos *Subulina octona* e dos ovos de *Paratanaisia bragai* para a realização da infecção experimental. 32

Figura 2: Esquema da divisão dos moluscos *Subulina octona* em grupo controle (não infectados – em vermelho) e infectados pelo trematódeo *Paratanaisia bragai* (verde), sua divisão em grupos e nos terrários. 34

CAPÍTULO I:

Figura 1: Relação entre parâmetros reprodutivos em *Subulina octona* e o tempo de infecção com *Paratanaisia bragai*, durante 40 dias pós infecção (d.p.i.). A) Número de ovos observados no trato reprodutivo, B) Número de moluscos eclodidos por moluscos e C) Conteúdo de galactogênio. 46

Figura 2: Corte histológico do tecido gonadal do molusco *Subulina octona*. A) Corte de um molusco não infectado, mostrando numerosos gametas masculinos (gm) em diferentes estágios de maturação em um oócito (o). Barra da escala = 100 µm. B) Corte de um molusco infectado pelo trematódeo *Paratanaisia bragai* aos 40 dias pós infecção (d.p.i.) mostrando numerosos gametas masculinos (gm) em diferentes estágios de maturação e dois oócitos (o) com citoplasma granular e núcleo (na) em processo apoptótico. Barra da escala = 100 µm. Coloração: tricrômico de Gomori.

CAPÍTULO II:

Figura 1: Relação entre o conteúdo de carboidratos em *Subulina octona* infectada experimentalmente por *Paratanaisia bragai* e o tempo de infecção. A) Conteúdo de glicose presente na hemolinfa do molusco (mg/dL). B) Atividade da lactato desidrogenase (LDH) (UI). Conteúdo de glicogênio (mg de glicose/g de tecido, peso fresco). C) Glândula digestiva e D) Massa cefalopediosa. (Regressão polinomial de terceira ordem).

Figura 2: Relação entre o conteúdo de ácidos orgânicos (mM) na hemolinfa de *Subulina octona* infectada experimentalmente por *Paratanaisia bragai* e o tempo pós-infecção. A) Concentração de ácido láctico (lactato). B) Concentração de ácido pirúvico (piruvato). C) Concentração de ácido oxálico (oxalato). D) Concentração de ácido succínico (succinato).

Figura 3: Corte histológico do molusco *Subulina octona*. A) Glândula digestiva de um molusco não infectado. Barra da escala = 100 µm. B) Glândula digestiva de um molusco infectado pelo trematódeo *Paratanaisia bragai*, onde estão indicados ácinos (a), núcleo (n), lúmen com presença de material amorfo (ma), vacúolos (v), espaços intraacinares (ei) e interacinares (ee). Barra da escala = 100 µm. C) Massa cefalopediosa de *Subulina octona* não infectada. Barra da escala = 100 µm. D) Massa cefalopediosa de um molusco infectado por *Paratanaisia bragai* com indicação dos feixes de fibras musculares longitudinais (fl) e verticais (fv) e núcleos (n). Barra da escala = 100 µm. Coloração: Ácido Periódico-Schiff (PAS).

CAPÍTULO IV:

Figura 1: Relação entre o tempo de infecção (em dias) de *Subulina octona* com larvas de *Paratanaisia bragai* e o conteúdo de cálcio A) na concha dos moluscos (mg CaCO₃/g de cinza); B) na hemolinfa (mg/dL) do molusco hospedeiro.

Figura 2: Relação entre o tempo de infecção com *Paratanaisia bragai* e o crescimento da concha de *Subulina octona*, expresso como comprimento de concha (em cm).

Figura 3: Histoquímica para cálcio em tecidos de *Subulina octona* experimentalmente infectada com *Paratanaisia bragai*. A) Secção de glândula digestiva de molusco não infectado (controle), com marcação intensa (setas) evidenciando a presença de grande quantidade de cálcio neste tecido; a – região acinar. Barra da escala = 50µm. B) Região da glândula digestiva de molusco infectado aos 30 d.p.i., com intensa presença de cálcio nos tecidos do hospedeiro

(setas) e nas larvas do parasito em desenvolvimento (L), com intensa desorganização da estrutura acinar. Barra da escala = 50µm. **C)** Região da glândula digestiva de molusco infectado aos 30 d.p.i. com aumento significativo da quantidade de cálcio nos tecidos de forma difusa (setas), evidenciando o lúmen tubular (l), vacuolização (*), desorganização da estrutura acinar e aumento da quantidade de material amorfo intra acinar (ma). Barra da escala = 50µm. **D)** Corte de parte da glândula digestiva (DG) e de ovotestis de molusco infectado aos 30 d.p.i., neste último observamos gametas femininos (o) e masculinos (s) em desenvolvimento, porém sem a presença de depósitos de cálcio na região da gônada. Barra da escala = 50µm. Coloração: von Kossa. Observações feitas em campo claro (A e B) e DIC (C e D).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Figura 1: Mapa metabólico de *Subulina octona* experimentalmente infectada por *Paratanaisia bragai* durante 40 dias pós infecção com a indicação dos parâmetros analisados no presente estudo. Em verde estão em destaque os parâmetros que apresentaram médias globais aumentadas e em vermelho os que apresentaram diminuição. Fonte: Autora.

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1: Desenvolvimento larval de *Paratanaisia bragai* para as duas espécies de hospedeiros intermediários, *Bradybaena similaris* e *Subulina octona* (BRANDOLINI e AMATO, 2006). 14

CAPÍTULO I:

Tabela 1: Efeitos da infecção experimental por *Paratanaisia bragai* sobre os parâmetros reprodutivos, expressos em média $\pm$ erro padrão da média ($\bar{X} \pm$ EPM), do molusco *Subulina octona*, seu hospedeiro intermediário, ao longo de 40 dias pós infecção (d.p.i). 44

CAPÍTULO II:

Tabela 1: Atividade da enzima lactato desidrogenase (UI) e concentração de glicose (mg/dL) na hemolinfa de *Subulina octona* experimentalmente infectada por *Paratanaisia bragai*, expressas como média $\pm$ erro padrão. 66

Tabela 2: Conteúdo de glicogênio na massa cefalopediosa e na glândula digestiva (mg glicose/g tecido, peso fresco) em *Subulina octona* experimentalmente infectada por *Paratanaisia bragai* durante 40 dias pós infecção (d.p.i), expresso como média $\pm$ desvio padrão. 69

Tabela 3: Conteúdo de ácidos orgânicos (mM) presentes na hemolinfa de *Subulina octona* após a infecção experimental por *Paratanaisia bragai*, expressos como média $\pm$ desvio padrão. 70

CAPÍTULO III:

Tabela 1: Efeitos da infecção experimental por *Paratanaisia bragai* sobre a concentração de proteínas totais, ureia e ácido úrico de seu hospedeiro experimental *Subulina octona*, expressos em média $\pm$ desvio padrão da média, ao longo de 40 dias pós infecção (d.p.i.). 91

Tabela 2: Avaliação da atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) em *Subulina octona* experimentalmente infectada por *Paratanaisia bragai*. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão da média, ao longo de 40 dias pós infecção (d.p.i.). 92

CAPÍTULO IV:

Tabela 1: Variação no conteúdo de cálcio na concha (expresso como mg de CaCO_3 /g de cinza) e na hemolinfa (expresso em mg de Ca^{++} /dL) de *Subulina octona* infectada experimentalmente por *Paratanaisia bragai*, ao longo do período pré-patente de infecção (expresso em dias). Valores expressos em média $\pm$ desvio-padrão ($\bar{x} \pm \text{DP}$) 109

Tabela 2: Variações no comprimento de concha (expresso em cm) de *Subulina octona* ao longo do desenvolvimento larval intramolusco de *Paratanaisia bragai* em infecção experimental. Média $\pm$ desvio-padrão = $X \pm DP$. 110

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO GERAL	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	8
2.1 <i>Paratanaisia bragai</i>	8
2.1.1 Classificação Taxonômica de <i>Paratanaisia bragai</i>	8
2.1.2 Morfologia geral dos Platyhelminthes com ênfase em <i>Paratanaisia bragai</i>	8
2.1.3 Estágios de desenvolvimento de <i>Paratanaisia bragai</i>	10
2.1.4 Ciclo biológico de <i>Paratanaisia bragai</i>	12
2.2 Hospedeiros definitivos	14
2.3 Hospedeiros intermediários	18
2.3.1 Classificação taxonômica de <i>Subulina octona</i>	19
2.3.2 Morfologia geral e ecologia de <i>Subulina octona</i>	19
2.3.3 Relação molusco x trematódeo	24
2.3.4 Parâmetros fisiológicos	24
2.3.4.1 Alterações reprodutivas em moluscos infectados	25
2.3.4.2 Metabolismo de carboidratos em moluscos infectados	26
2.3.4.3. Metabolismo de proteínas	27
2.3.4.4. Metabolismo de cálcio	28
2.3.4.5 Mapa Metabólico	29
3 METODOLOGIA GERAL	31
3.1 Obtenção e criação de <i>Subulina octona</i>	31
3.2 Obtenção dos ovos de <i>Paratanaisia bragai</i>	32
3.3 Infecção experimental	32
CAPÍTULO I: AVALIAÇÃO DO PERFIL REPRODUTIVO DE SUBULINA OCTONA (GASTROPODA, SUBULINIDAE) EXPERIMENTALMENTE INFECTADA POR PARATANAISIA BRAGAI (DIGENEA, EUCOTYLIDAE)	35
Resumo	36
Abstract	37
1 INTRODUÇÃO	38

2 MATERIAL E MÉTODOS	42
2.1 Coleta e processamento das amostras	42
2.2 Análise estatística	42
3 RESULTADOS	43
4 DISCUSSÃO	48
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
CAPÍTULO II: AVALIAÇÃO DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS DO MOLUSCO TERRESTRE SUBULINA OCTONA (BRUGÜIERE, 1789) (GASTROPODA, SUBULINIDAE) EXPERIMENTALMENTE INFECTADO PELO TREMATÓDEO PARATANAISIA BRAGAI (SANTOS, 1934) (DIGenea, EUCOTYLIDAE)	58
Resumo	59
Abstract	60
1 INTRODUÇÃO	61
2 MATERIAL E MÉTODOS	63
2.1 Coleta das amostras	63
2.2 Determinação da concentração de glicose e da atividade da LDH	63
2.3 Determinação do conteúdo de glicogênio	64
2.4 Determinação dos ácidos orgânicos	64
2.5 Análises histoquímicas	64
2.6 Análises estatísticas	65
3 RESULTADOS	66
4 DISCUSSÃO	74
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
CAPÍTULO III: EFEITOS DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR PARATANAISIA BRAGAI (DIGenea, EUCOTYLIDAE) SOBRE O METABOLISMO DE PRODUTOS NITROGENADOS E ASPECTOS FISIOLÓGICOS RELACIONADOS EM SEU HOSPEDEIRO INTERMEDIÁRIO EXPERIMENTAL SUBULINA OCTONA (GASTROPODA, SUBULINIDAE)	83
Resumo	84
Abstract	85
1 INTRODUÇÃO	86
2 MATERIAL E MÉTODOS	88

2.1 Coleta e processamento das amostras	88
2.2 Análise estatística	89
3 RESULTADOS	90
4 DISCUSSÃO	93
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
CAPÍTULO IV: ALTERAÇÕES NO METABOLISMO DE CÁLCIO E CRESCIMENTO DA CONCHA DO MOLUSCO TERRESTRE <i>SUBULINA OCTONA</i> (GASTROPODA, SUBULINIDAE) EXPERIMENTALMENTE INFECTADO POR <i>PARATANAISIA BRAGAI</i> (DIGENEA, EUCOTYLIDAE)	99
Resumo	100
Abstract	101
1 INTRODUÇÃO	102
2 MATERIAL E MÉTODOS	105
2.1 Coleta e processamento das amostras	105
2.2 Análise estatística	106
3 RESULTADOS	107
4 DISCUSSÃO	114
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117
CONSIDERAÇÕES FINAIS	122
CONCLUSÕES	126
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	128
ANEXOS	138
Certificado de aprovação da Comissão de Ética para o Uso de Animais	139
Cromatogramas e dados dos padrões dos ácidos orgânicos	140
Artigo publicado	144

1 INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é considerado um dos países com maior biodiversidade do mundo, abrangendo cerca de 10% de todas as espécies conhecidas existentes no planeta, sendo a diversidade ornitológica a terceira maior dentre todos os países, atrás da Colômbia e do Peru (LOPES, 2003; BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2020). Dentre as atividades clandestinas no Brasil, o tráfico de animais ocupa a terceira posição, ficando atrás apenas do tráfico de drogas e de armas (MENDES, 2018). Vários autores citam que os animais mais apreendidos no comércio ilegal são as aves, devido a sua beleza, canto e comportamento dócil ou de fácil manuseio, portanto, mais suscetíveis à domesticação (MENDES, 2018). A retirada, e consequente inserção, de aves em locais diferentes dos seus habitats de origem, pode levar à disseminação de vários patógenos, que podem contaminar outros animais e até os seres humanos, gerando grandes transtornos como pandemias e epidemias (CAVALCANTI; NUNES, 2019).

Diversas espécies de aves realizam a migração, um fenômeno que pode contribuir para que aves selvagens infectadas introduzam helmintos em novas áreas, o que representa um grande risco de exposição à infecção para os hospedeiros nativos (HUFFMAN, 2008). Além disso, aves selvagens infectadas representam perigo para a transmissão às aves de companhia durante o compartilhamento de alimentos (GOMES et al., 2005).

A avicultura industrial é um dos grandes pilares da economia brasileira que, com um dos melhores índices mundiais, se tornou o segundo maior produtor e exportador de carne de frangos do mundo. Na tentativa de diminuir a quantidade de resíduos químicos em uma pelomundial por produtos orgânicos, há um aumento do número de criações de frango colonial/caipira que poderá resultar em um aumento dos problemas parasitários (CARDOZO; YAMAMURA, 2004).

Paratanaisia bragai (Santos, 1934) é um digenético que utiliza aves como hospedeiros definitivos, apresentando baixa patogenicidade, o que pode ser observado quando há uma infecção média e a não verificação da reação inflamatória, como observado por Pinto e colaboradores (2004). No entanto, uma elevada carga parasitária poderia ser responsável pelo desenvolvimento da monostomose renal que se caracteriza pela perda de peso das aves,

diarreia intermitente com sangue e muco, podendo até mesmo levar à morte (ARNIZAUT et al., 1992), apesar disso há significativo negligenciamento da doença.

Algumas espécies de aves foram identificadas como hospedeiros definitivos deste parasito, incluindo: *Columba livia* Gmelin, 1789 - pombo; *Gallus gallus domesticus* (Linnaeus, 1758) - galinha doméstica; *Columbina talpacoti* (Temminck, 1810) - rolinha roxa; *Rhynchotus rufescens* (Temminck, 1815) - perdiz ou perdigão; *Numida meleagris* (Linnaeus, 1758) - galinha d'angola; *Meleagris gallopavo* Linnaeus, 1758 - peru; *Lybius bidentatus* (Shaw, 1799) - barbete; *Phasianus colchicus* Linnaeus, 1758 – faisão; *Ara ararauna* Linnaeus, 1758 – arara azul e amarela; *Propyrrhura maracana* (Vieillot, 1816) – ararinha maracanã e *Pyrrhura leucotis* (Kuhl, 1820) - tiriba-de-orelha-branca (MENEZES et al., 2001; PINTO et al., 2004; BRENER et al., 2006; GOMES et al., 2005; ROTSTEIN et al., 2005; LUPPI et al., 2007; TAVELA et al., 2014). As aves adquirem a infecção por *P. bragai* após a ingestão de moluscos infectados contendo metacercárias (MENEZES et al., 2001).

Considerando o conceito de *One Health* onde um dos principais objetivos da saúde única é conectar esforços de diferentes áreas para trabalhar em sinergia na resolução de problemas de saúde humana, animal e ambiental (SHAN; KHAN, 2019). O estudo da relação entre parasitos e seus hospedeiros é fundamental para a elaboração de estratégias de controle parasitário, de saúde animal e saúde ambiental.

Maldonado (1945a) aponta o molusco terrestre *Subulina octona* (Brugüiere, 1789) como hospedeiro intermediário, no qual o parasito evolui até o estágio infectante para as aves. Estudos posteriores, verificaram que *Leptinaria unilamellata* (D'Orbigni, 1835) também atua como hospedeiro intermediário desse parasito no Brasil (KELLER; ARAUJO, 1992).

Os hospedeiros intermediários (moluscos) se infectam passivamente, pela ingestão dos ovos embrionados de *P. bragai*, que são eliminados juntamente com os produtos de excreção do hospedeiro definitivo (aves). Após a eclosão dos miracídios, duas gerações de esporocistos, estágios de intensa reprodução assexuada, se desenvolverão dentro do molusco, seguidos pelo desenvolvimento das cercárias e metacercárias. O hospedeiro definitivo adquire a infecção através da ingestão dos moluscos infectados contendo metacercárias (XAVIER, 2015).

Aspectos relacionados à biologia reprodutiva dos moluscos expostos a condição de infecção podem ser alterados e estarem associados ao fenômeno da castração parasitária que é

definida como uma inibição total ou parcial da atividade reprodutiva do hospedeiro (BAUDOIN, 1975). Tal fenômeno é resultado de ações físicas ou fisiológicas do parasito que pode, direta ou indiretamente, comprometer o desenvolvimento gonadal do hospedeiro (TUNHOLI-ALVES et al., 2011).

Um estudo publicado por Faro e colaboradores (2013) estudando os aspectos reprodutivos na interface *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818)/*Schistosoma mansoni* Sambon, 1917, observou o fenômeno da castração parasitária como uma combinação de processos diretos (destruição dos tecidos gonadais) e processos indiretos (inanição dos moluscos causada pelo desenvolvimento dos estágios larvais intramolusco).

Tunholi-Alves e colaboradores (2011) verificaram uma redução contínua dos parâmetros reprodutivos de *B. glabrata* experimentalmente infectadas por *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935), embora não tenha ocorrido a interrupção da atividade reprodutiva, o fenômeno foi caracterizado como castração parasitária parcial e indireta.

Brandolini e colaboradores (1997) estudaram a ação do parasitismo por *P. bragai* sobre a mortalidade, reprodução, crescimento, concentração de cálcio nas conchas e consumo de oxigênio pelo molusco *S. octona*, verificando um aumento significativo na mortalidade dos moluscos infectados, assim como alterações reprodutivas que são característicos do fenômeno da castração parasitária parcial e indireta, indicado através da avaliação da produção de ovos. Também foram observadas diferenças significativas em relação ao peso das conchas e a concentração de cálcio dos moluscos infectados em comparação com os moluscos controle.

Posteriormente, os mesmos autores verificaram, através de estudos histológicos, a ação mecânica de metacercárias de *P. bragai* sobre o ovotestis do molusco *S. octona*, caracterizando a influência do parasito sobre a atividade reprodutiva como uma castração parasitária do tipo direta e nutricional, uma vez que houve uma acentuada destruição dos ácinos da glândula digestiva, rim e ovotestis de *S. octona* (BRANDOLINI; AMATO, 2006).

No entanto, alguns estudos mostraram um aumento da atividade reprodutiva do hospedeiro como consequência da infecção por larvas de trematódeos digenéticos. Minchella (1985) denominou esse fenômeno de compensação da fecundidade, no qual os moluscos infectados aumentam seus esforços reprodutivos, minimizando perdas futuras que seriam ocasionadas por estresse. Tunholi e colaboradores (2011), ao estudarem os efeitos da infecção

experimental com diferentes cargas miracidiais (5 e 50) de *Echinostoma paraensei* (Lie & Basch, 1967) em *B. glabrata*, observaram aumento da atividade reprodutiva dos moluscos infectados e concluíram que a infecção induziu alterações significativas no perfil reprodutivo observado, sugerindo que esse comportamento frente à infecção seria uma estratégia para a manutenção da espécie.

Dessa forma, não é possível observar um padrão, sugerindo que as variações observadas nos aspectos reprodutivos de moluscos infectados são dependentes do modelo utilizado e que, no caso dos trematódeos digenéticos, em geral, há uma significativa especificidade do parasito pelo molusco hospedeiro intermediário, portanto, cada parasito é capaz de induzir alterações específicas em seus hospedeiros específicos.

Esclarecer os efeitos dessa relação parasito-hospedeiro, usando como modelo experimental *P. bragai* – *S. octona* sob alguns aspectos reprodutivos e fisiológicos são objetivos do presente estudo. Além dos objetivos ligados diretamente à análise dos resultados obtidos, objetiva-se indiretamente que o presente estudo incentive a realização de trabalhos que tenham como foco a avaliação de parâmetros relacionados a reprodução, ao metabolismo, a fisiologia e a histologia dos moluscos terrestres em condições de estresse parasitário que são notoriamente escassos.

O galactogênio, um polímero de D- e L-galactose, é encontrado na glândula de albúmem dos moluscos e possui grande relevância para a reprodução, pois é um importante componente do fluído perivitelínico, que envolve o embrião e garante o fornecimento de nutrientes para este durante o desenvolvimento no interior do ovo e no período após a eclosão (GOUDSMIT; ASHWELL, 1965), garantindo a sobrevivência e o desenvolvimento do embrião e dos moluscos recém eclodidos. Com isso, alterações nos conteúdos de galactogênio, refletirão na viabilidade dos embriões em formação nos ovos (TUNHOLI-ALVES et al., 2011) e na sobrevivência dos moluscos recém eclodidos.

Wisnivesk (2003) sugere que se avalie o papel do parasitismo na dinâmica da população de hospedeiros, enfatizando a necessidade de se estudar tanto a população de hospedeiro como a população de parasitos, pois as infecções parasitárias influenciam a dinâmica da população dos hospedeiros, afetando parâmetros reprodutivos e de sobrevivência

da espécie, diminuindo a habilidade de competição ou aumentando a vulnerabilidade para os predadores, além de atuar nas interações intra e interespecíficas dos parasitos co-ocorrentes.

As larvas dos trematódeos conquistam um novo nicho ecológico assim que conseguem penetrar no primeiro hospedeiro intermediário. Esse novo ambiente é constituído principalmente pela hemolinfa do molusco. Dessa forma, o parasito passa a competir por nutrientes com o hospedeiro e, além disso, libera seus produtos de excreção/secreção diretamente na hemolinfa, gerando alterações na constituição da mesma. Ainda, sob a ação destes produtos de secreção, a larva pode modular o sistema neuroendócrino (SNE) e sistema interno de defesa (SID) do molusco hospedeiro infectado (BECKER, 1980; BROCKELMAN et al, 1976).

Segundo Tunholi e colaboradores (2011), a interação entre o hospedeiro intermediário e os helmintos pode resultar em uma redução da taxa metabólica dos moluscos hospedeiros, que começam a usar suas reservas energéticas para manter suas funções vitais, assim como para suprir as necessidades energéticas das larvas durante os estágios de desenvolvimento intramolusco.

Entre as principais alterações metabólicas frequentemente observadas, temos as mudanças no metabolismo de carboidratos, especialmente nos gastrópodes pulmonados, onde a produção de energia é mantida principalmente através do consumo de glicose (JOOSSE, 1988). Thompson e Lee (1986), verificaram que os níveis de glicose presentes na hemolinfa dos moluscos são regulados através de mecanismos fisiológicos integrados, que tem por objetivo garantir que as variações ocorridas sejam compatíveis com a manutenção da vida do molusco hospedeiro.

Uma das estratégias para manter a normoglicemia, é a mobilização das reservas de glicogênio localizadas principalmente na glândula digestiva (PINHEIRO et al., 2009) e no tecido muscular (PINHEIRO; AMATO, 1994) dos moluscos.

Também podem ser utilizadas vias metabólicas alternativas na tentativa de normalizar seu balanço energético fundamental para atender as suas necessidades vitais. As alterações nos conteúdos de carboidratos resultam em alterações nos estoques de proteínas e aminoácidos livres na hemolinfa dos moluscos infectados e na aceleração do metabolismo anaeróbio (BECKER, 1980).

A enzima citoplasmática lactato desidrogenase (D-desidrogenase láctica [LDH]) (EC1.1.1.27; EC1.1.1.28) catalisa a reação reversível de oxidação do L- D-lactato a piruvato com participação do NAD^+ como aceptor de hidrogênio (MOSS; HENDERSON, 1998). Dessa forma, quando há um aumento da atividade da LDH, podemos observar a predominância do metabolismo anaeróbio sobre o metabolismo aeróbio.

Outros indicadores dessa mudança metabólica são os conteúdos de alguns ácidos orgânicos relacionados às reações de oxidações biológicas, como o ciclo de Krebs, (ácido oxálico, ácido succínico e ácido pirúvico) ou que indicam a utilização de uma via metabólica anaeróbia alternativa (ácido láctico) (TUNHOLI et al., 2013).

As proteínas também podem ser utilizadas como substratos energéticos alternativos, produzindo intermediários glicídicos a partir da gliconeogênese. No entanto, ao realizar a desaminação dos aminoácidos, a concentração de amônia é aumentada na hemolinfa, sendo necessário excretar uma maior quantidade de produtos nitrogenados (ureia e ácido úrico). Moluscos terrestres são ureotélicos, porém com os níveis de amônia elevados, podem excretar predominantemente ácido úrico (MARTINS, 2018).

As transaminases (AST [EC 2.6.1.1] e ALT [EC 2.6.1.2]) são marcadores de danos teciduais. Além disso, constituem um grupo de enzimas que catalisam a interconversão dos aminoácidos em α -cetoácidos através da transferência de grupos amino, ou seja, são indispensáveis para a gliconeogênese, pois disponibilizam esqueletos carbônicos para serem utilizados nessa via alternativa (BONFIM et al., 2014).

A presente tese é dividida em quatro capítulos, com diferentes objetivos gerais e específicos, mas que estão integrados para compor o cenário de alterações causadas no metabolismo geral e na reprodução dos moluscos *S. octona* em decorrência da infecção experimental pelo digenético *P. bragai*.

O primeiro capítulo possui como objetivo geral verificar as alterações no perfil reprodutivo dos moluscos da espécie *S. octona* submetidos à infecção experimental por *P. bragai*. Dessa forma, tem-se como objetivos específicos a determinação do número de ovos eclodidos/molusco e do número de ovos no trato reprodutivo/molusco, a quantificação do conteúdo de galactogênio e a análise histopatológica dos tecidos gonadais (ovotestis) dos moluscos.

Os capítulos seguintes, voltam-se à caracterização do perfil metabólico dos moluscos infectados por *P. bragai*. Portanto, o segundo capítulo teve como objetivo geral verificar as alterações no metabolismo de carboidratos de *S. octona* experimentalmente infectada por *P. bragai*, tendo como objetivos específicos verificar as alterações no conteúdo de glicogênio presente na glândula digestiva e na massa cefalopediosa dos moluscos infectados, verificar a concentração de glicose e a atividade da enzima D- e L-lactato desidrogenase (EC1.1.1.27 e EC1.1.1.28) (LDH) e as concentrações de ácidos orgânicos (ácido oxálico, succínico, pirúvico e láctico) presentes na hemolinfa dos moluscos. Bem como, analisar através da histoquímica os tecidos de reserva de carboidratos (glândula digestiva e da massa cefalopediosa).

Já o terceiro capítulo tem por objetivo geral analisar as alterações no metabolismo de produtos nitrogenados e aspectos fisiológicos relacionados em moluscos da espécie *S. octona* experimentalmente infectados por *P. bragai*. Para alcançar o objetivo geral, foram determinados como objetivos específicos a análise do conteúdo de proteínas totais, ureia e ácido úrico, assim como na 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) presentes na hemolinfa dos hospedeiros intermediários.

O quarto capítulo teve por objetivo avaliar as alterações no conteúdo de cálcio e crescimento da concha em decorrência da infecção experimental por *P. bragai* em moluscos da espécie *S. octona*. Como objetivos específicos para esse último capítulo tem-se a análise do conteúdo de cálcio presente na concha e na hemolinfa dos moluscos relacionando-os com o crescimento e metabolismo geral dos hospedeiros intermediários.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Paratanaisia bragai*

2.1.1 Classificação Taxonômica de *Paratanaisia bragai*

A sistemática dos platelmintos tem passado por diversas mudanças, pois ainda não se chegou a um consenso entre os pesquisadores. Dessa forma, dependendo do autor a classificação pode variar.

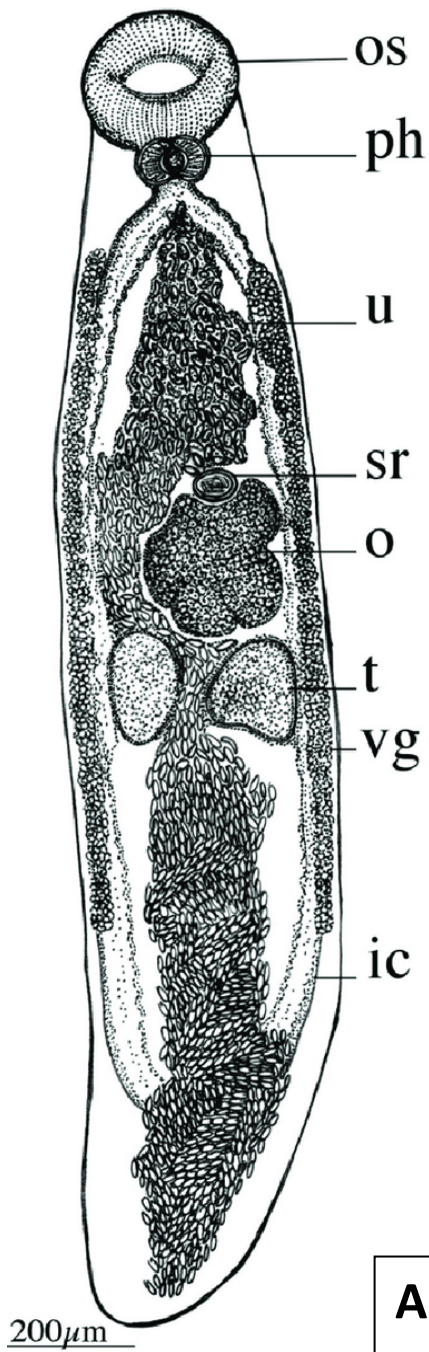
Paratanaisia bragai foi inicialmente descrita como *Tamerlanea bragai* por Santos em 1934. Muitas mudanças ocorreram na classificação taxonômica desse parasito. Atualmente, a classificação aceita para *P. bragai* foi proposta por Freitas em 1959 e revisada por Kanev e colaboradores em 2002. Esse parasito pertence ao filo Platyhelminthes e está inserido na classe Trematoda, Rudolphi, 1808 e subclasse Digenea Carus, 1863.

Kanev e colaboradores (2002), realizaram uma revisão da família Eucotylidae e incluíram as duas subfamílias Eucotylinae Skrjabin, 1924 e Tanaisiinae Freitas, 1951 (sinônimo de Tanaisiinae Yamaguti, 1958) na chave taxonômica. Freitas (1951) dividiu Eucotylidae, com base em caracteres específicos, como a presença ou ausência da musculatura transversal cefálica e a formação dos cecos intestinais posteriormente fusionados ou não. Yamaguti (1958) considerou, assim como Freitas, a divisão em duas subfamílias. Em Tanaisiinae foram alocados os gêneros *Tanaisia* Skrjabin, 1924, *Paratanaisia* que possui como espécie tipo *P. bragai* (Santos, 1934) Freitas, 1959 e *Tamerlania* Skrjabin, 1924.

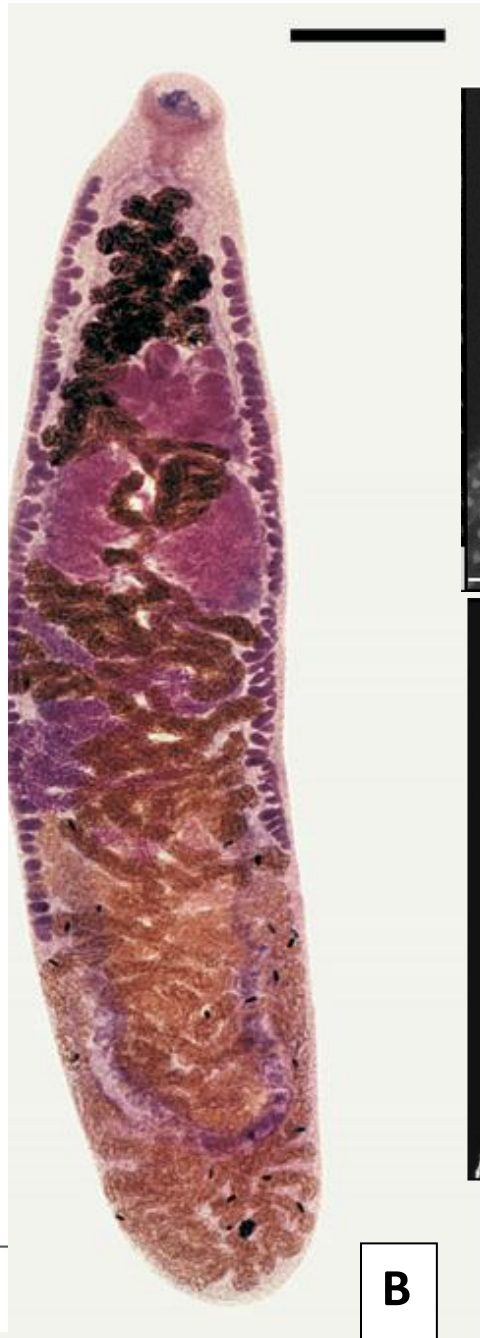
2.1.2 Morfologia geral dos Platyhelminthes com ênfase em *Paratanaisia bragai*

De acordo com Rey (2008), os Platyhelminthes são vermes achatados dorsoventralmente que apresentam simetria bilateral, órgãos sensitivos e de fixação na porção anterior do corpo que não possuem cavidade celomática (Figura 1). Além disso, não contam com sistema circulatório e nem respiratório, porém possuem sistema digestório incompleto, quando presente, e excreção realizada por protonefrídeos associados a células flama. A maioria dos digenéticos é hermafrodita e isso possibilita a ocorrência de autofecundação. Possuem o tegumento como camada mais externa ao corpo, nos trematódeos esse tegumento pode ou não conter espinhos, escamas, papilas ou cerdas que recobrem parcialmente ou totalmente o seu corpo (REY, 2008).

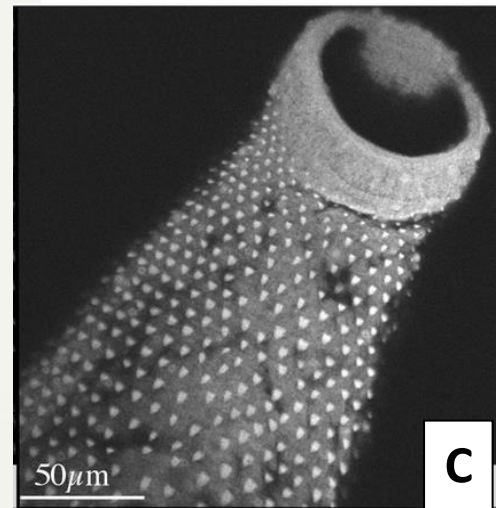
Figura 1: *Paratanaisia bragai*. A) Adultos pós-ovígeros. os: ventosa oral; ph: faringe; u: útero; sr: receptáculo seminal; o: ovário; t: testículo; vg: glândula vitelina; ic: ceco intestinal. Barra: 200µm. Fonte: D'Avila et al. (2017). B) Espécime de *Paratanaisia bragai*, recuperado do rim de *Meleagris gallopavo* e processado. Barra: 0.2 mm. Fonte: Brener et al. (2006). C) Ventosa oral de adultos pré-ovígeros. Barra: 50µm. Fonte: D'Avila et al. (2017). D) Ventosa oral dos adultos pós-ovígeros. Barra: 150µm. Fonte: D'Avila et al. (2017).



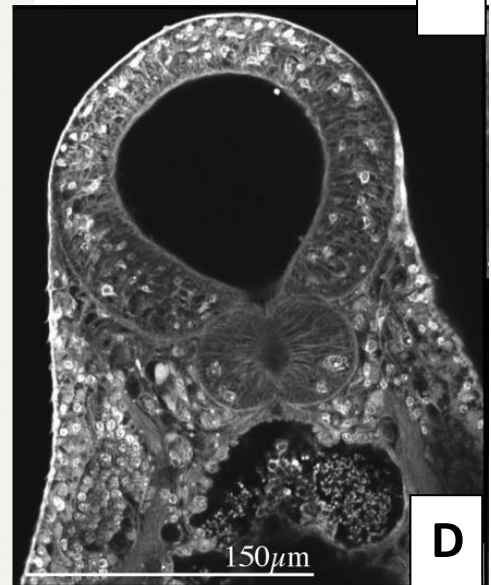
A



B



C



D

2.1.3 Estágios de desenvolvimento de *Paratanaisia bragai*

O ciclo biológico de *P. bragai* possui o ovo, eliminado já embrionado pelo verme adulto, e diferentes estágios larvais, sendo eles: miracídio, esporocisto de primeira geração; esporocisto de segunda geração, cercária, metacercária e adulto (Figura 2).

De acordo com Maldonado (1945a) a casca do ovo de *P. bragai* é lisa, no entanto Xavier (2015) verificou através da microscopia eletrônica de varredura que a casca do ovo é lisa de aspecto porosa. Os ovos possuem casca espessa, castanha, alongada e ligeiramente assimétrica, um opérculo na porção anterior e uma pequena protuberância na porção posterior. Apresentam, em média, 30µm de comprimento por 15µm de largura. O miracídio está totalmente desenvolvido e infectivo na oviposição (MALDONADO, 1945a).

A eclosão do miracídio ocorre na extremidade distal do estômago do molusco. Esse estágio possui cerca de 30µm de comprimento, piriforme, cílios distribuídos de maneira uniforme, dando ao organismo um movimento suave que é acompanhado por contrações peristálticas (MALDONADO, 1945a).

O miracídio atinge os tecidos do molusco ao atravessar o epitélio intestinal e, então transforma-se em um esporocisto de primeira geração que aparece como uma massa arredondada de células germinativas, com núcleos bem marcados que inicialmente se localizam junto a parede do intestino e à medida que evoluem, espalham-se entre os ácinos da glândula digestiva (BRANDOLINI; AMATO, 2006). A produção de novas bolas germinativas continua por um tempo considerável. No entanto, a capacidade germinativa depende em grande parte das relações espaciais dentro do hospedeiro (MALDONADO, 1945a).

O desenvolvimento da segunda geração de esporocistos assemelha-se ao da maioria dos trematódeos. As células germinativas podem se dividir e se separar repetidamente. As bolas germinativas crescem por multiplicação celular. Oito a dez dias após o surgimento, elas saem do esporocisto de primeira geração. Por volta do décimo segundo dia, começa a diferenciação dessa massa em uma forma final (MALDONADO, 1945a). O esporocisto não deve ser considerado apenas como um saco germinativo como proposto por Cable em (1971) pois em trabalho realizado por Pinheiro e colaboradores (2011), esse estágio é descrito como uma estrutura dinâmica com intensos processos de absorção e secreção, fundamentais para a sobrevivência das larvas.

As cercárias surgem através da proliferação das células germinativas dentro do esporocisto de segunda geração. Embora um esporocisto possa originar apenas uma cercária, a maioria dos esporocistos irá produzir várias cercárias em diferentes intervalos durante o desenvolvimento. As primeiras cercárias totalmente desenvolvidas aparecem na quarta semana de infecção. Seu corpo é cilíndrico e afunilado posteriormente e coberto por uma cutícula fina e rugosa (MALDONADO, 1945a). Brandolini e Amato (2006) verificaram que as cercárias apresentavam movimentação bastante lenta quando ainda estavam no esporocisto de segunda geração, porém quando liberadas, a movimentação se tornava mais rápida e vigorosa, embora por pouco tempo.

Decorridos 30 dias da infecção, as cercárias que atingiram a maturidade encistam dentro do esporocisto. O cisto formado é espesso, resistente e transparente, a estrutura é oval, e mede cerca de 146µm por 36µm. Nas infecções antigas, as cercárias encistadas podem ser encontradas em massas ainda circundadas por remanescentes do esporocisto de segunda geração em desintegração, embora em muitos casos esse esporocisto desaparece completamente (MALDONADO, 1945a). Assim, a metacercária se constitui um estágio de resistência e de dispersão espacial e temporal. Xavier (2015), através da microscopia eletrônica de varredura dos cortes histológicos, visualizou detalhadamente a estrutura do cisto das metacercárias de *P. bragai*, verificando a presença de três camadas com espessuras diferentes na composição do cisto, achados importantes para esclarecer a resistência das metacercárias tanto à fatores intrínsecos quanto a fatores extrínsecos.

Quando saí do cisto, já no hospedeiro definitivo, o parasito adquire o formato característico dos platelmintos (corpo achatado dorsoventralmente), medindo cerca de 360µm de comprimento. Em seu desenvolvimento até o estágio adulto, o revestimento do corpo torna-se espesso e estriado e verifica-se a presença de papilas, a cobertura do corpo é alterada e o crescimento do parasito é intenso. Entre o décimo primeiro e o décimo quinto dia, o parasito atinge a idade adulta. Desse momento do ciclo em diante, as mudanças morfológicas consistem no aumento de todo o corpo e no acúmulo gradual de ovos até que eles obscureçam praticamente todos os órgãos. A oviposição começa durante a quarta semana de infecção (MALDONADO, 1945a). Keller e Araújo (1992) observaram aos 25 dias pós infecção, o início do aparecimento de ovos nos produtos de excreção de espécimes jovens de *G. gallus*

domesticus, indicando que esse seria o período pré-patente de *P. bragai* no hospedeiro definitivo.

2.1.4 Ciclo biológico de *Paratanaisia bragai*

Os ovos embrionados de *P. bragai* são eliminados juntamente aos produtos de excreção das aves parasitadas. Os moluscos adquirem a infecção de forma passiva ao se alimentarem desses ovos. Brandolini e Amato (2006) observaram a presença do ovo de *P. bragai* no trato digestivo de *S. octona* após uma hora do contato inicial com os ovos.

Segundo Maldonado (1945a), no estômago do molusco ocorre a eclosão dos miracídios e estes conseguem atravessar a parede do trato digestivo. Posteriormente, desenvolvem-se em esporocistos de primeira geração que se localizam na parede do intestino. Conforme esse estágio evolui, ele passa a ocupar outras estruturas do molusco, principalmente a glândula digestiva.

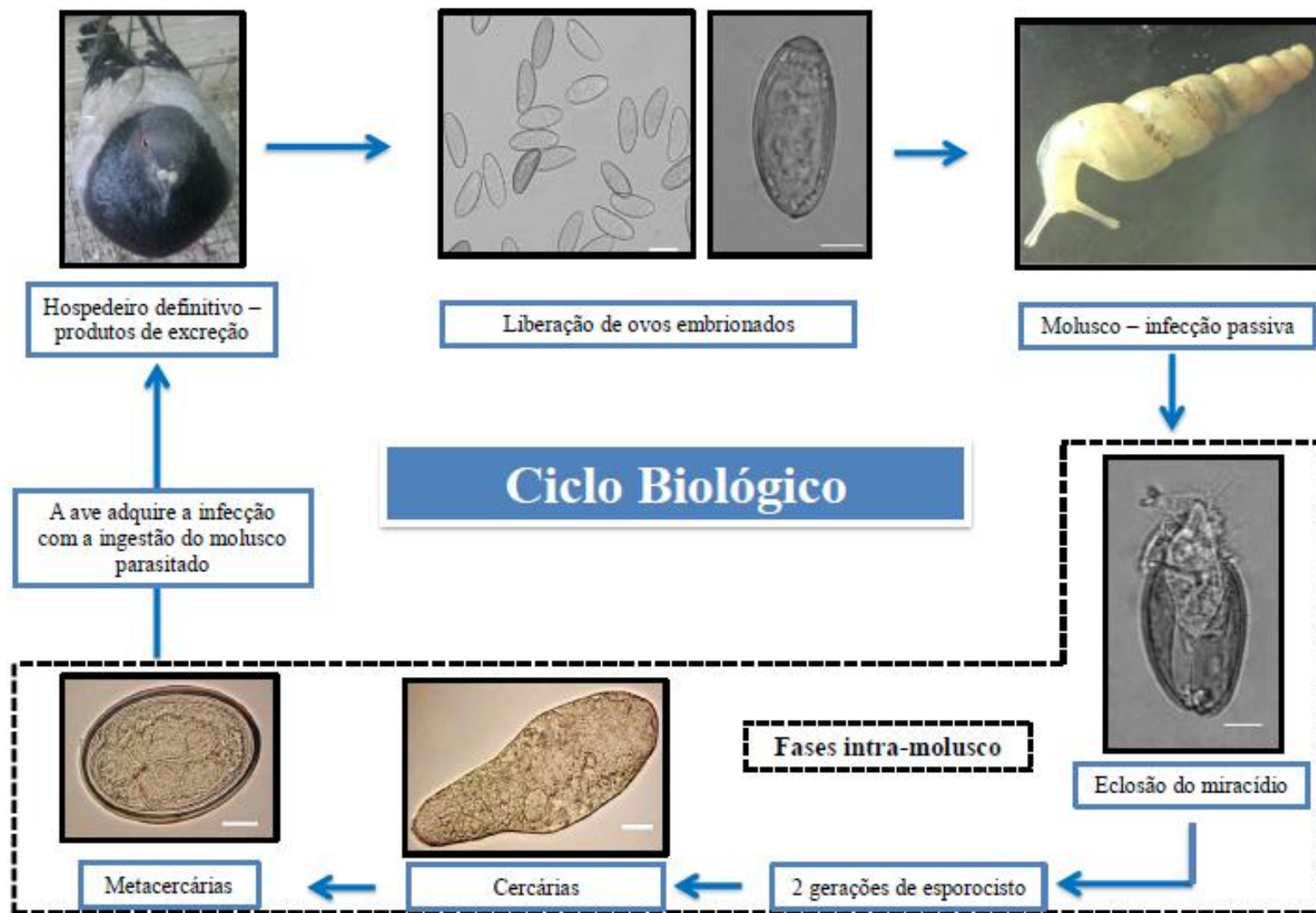
Os esporocistos de primeira geração dão origem aos esporocistos de segunda geração que foram observados por Brandolini e Amato (2006) na glândula digestiva e no rim do molusco infectado.

Aos 32 dias de infecção, cercárias podem ser observadas na glândula digestiva, assim como, metacercárias que podem ser visualizadas na massa visceral e nos ácinos da glândula digestiva dos moluscos infectados por *P. bragai* (BRANDOLINI; AMATO, 2006).

As aves adquirem a infecção ao ingerir moluscos infectados com o trematódeo *P. bragai*, no interior do hospedeiro definitivo ocorre o desencistamento da metacercária e o desenvolvimento ao estágio adulto a liberação de ovos nos produtos de excreção ocorre entre 25 – 28 dias após a ingestão das metacercárias (MALDONADO, 1945a; KELLER; ARAÚJO, 1992).

A figura 2 mostra como esse ciclo acontece com fotografias do ovo, de alguns dos diferentes estágios larvais do parasito e dos hospedeiros (definitivo e intermediário) utilizados nesse estudo.

Figura 2: Ciclo biológico de *Paratanaisia bragai*. Fonte: Xavier (2015).



A tabela 1, apresenta resumidamente os estágios larvais em desenvolvimento no molusco em relação ao tempo de infecção observados por Brandolini e Amato (2006). Além disso, os autores também verificaram a localização desses parasitos em desenvolvimento.

Tabela 1: Desenvolvimento larval de *Paratanaisia bragai* para as duas espécies de hospedeiros intermediários, *Bradybaena similaris* e *Subulina octona* (BRANDOLINI; AMATO, 2006).

Estágio de desenvolvimento	Tempo após o contato inicial com os ovos do parasito	Local
Esporocisto 1ª geração	6 – 10 dias	Parede intestinal, Ácinos da glândula digestiva
Esporocisto 2ª geração	15, 20, 25 dias	Glândula digestiva/Rim
Cercária	32 dias	Glândula digestiva
Metacercária	32 e 40 dias	Glândula digestiva

2.2 Hospedeiros definitivos

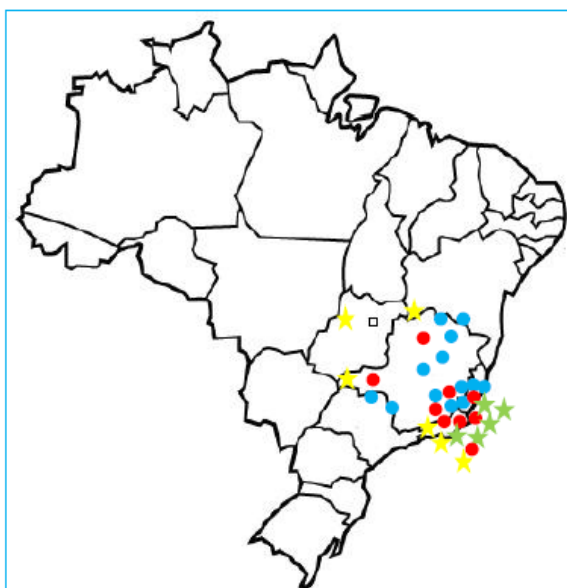
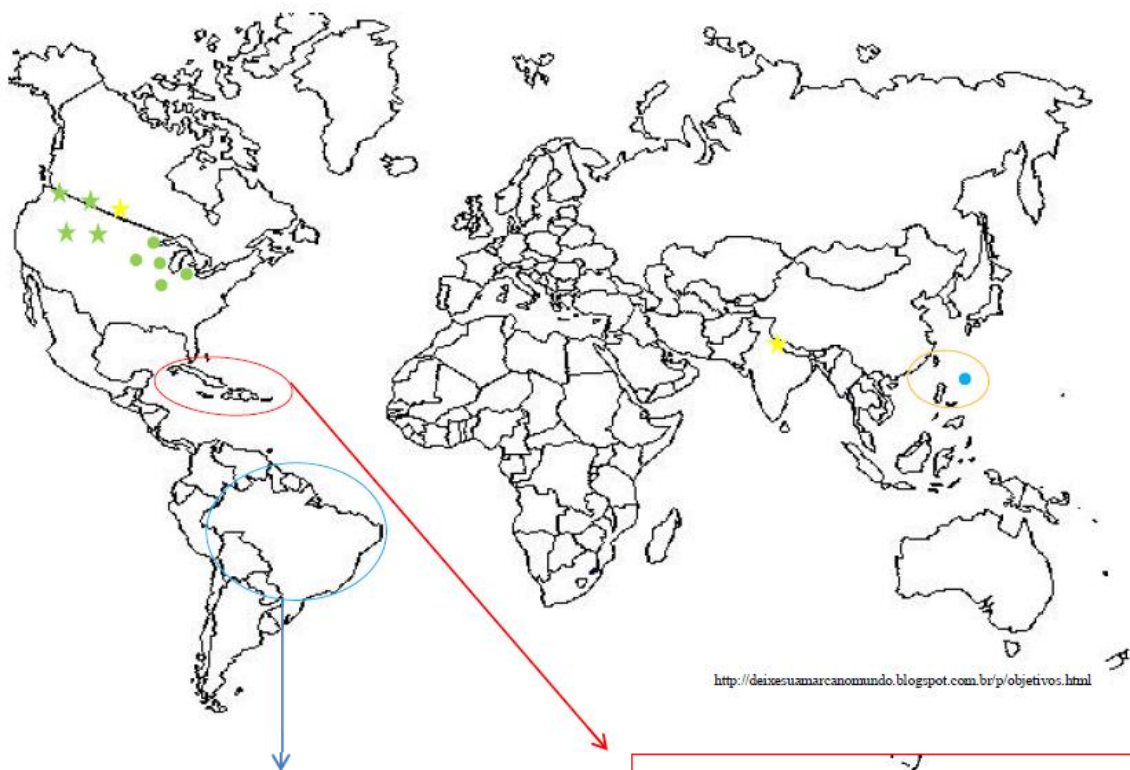
O trematódeo *P. bragai* foi registrado na América do Sul, América Central, Oceania, Europa e Ásia (KELLER; ARAUJO, 1992; KUMAR et al., 2009). Diversos autores têm reportado casos de *P. bragai* em diferentes espécies de aves na Costa Rica (ALFARO-ALARCON et al., 2015); Porto Rico (ARNIZAUT et al., 1992); Reino Unido (UNWIN et al., 2013).

No Brasil, os registros de aves parasitadas por *P. bragai* ocorreram nos Estados do Paraná (TARODA et al., 2013), Goiás (CARNEIRO et al., 1975), Rio de Janeiro (SANTOS, 1934 *apud* PINTO et al., 2004; MENEZES et al., 2001), São Paulo (SANTI et al., 2018, SANTI et al., 2017; SILVA et al., 2016) e Minas Gerais (TEODORO et al., 2018, TAVELA et al., 2014) (Figura 3).

No geral, as aves parasitadas são Columbiformes, Galliformes, Passeriformes, Psittaciformes (SANTI et al., 2017) (Figura 4). Os relatos acerca da patogenicidade destes trematódeos são controversos, variando de ausência de sinais clínicos e alterações macro ou microscópicas (GOMES et al., 2005), até graves alterações no sistema renal das aves infectadas (MENEZES et al., 2001; XAVIER et al., 2015). De acordo com Gomes e colaboradores (2005), o local da infecção, linhagem do parasito e do hospedeiro podem determinar a gravidade das lesões observadas nas aves parasitadas.

Estas características da infecção por *P. bragai* aumentam a relevância do estudo, em detalhes, da relação parasito hospedeiro, uma vez que o fato de haver animais infectados, portanto, eliminando ovos junto aos produtos de excreção e sem sinais clínicos, os tornam transmissores assintomáticos, contribuindo para a dispersão do parasito e aumento da ocorrência da doença entre diversas espécies de aves. Considerando que o comércio de aves vivas, se dá com o transporte destas em veículos abertos com distâncias consideráveis entre as granjas e os locais de abate, somando, ainda, a este fator a intensa atividade de contrabando de aves selvagens em nosso país, alcançando cerca de 80% do total de animais contrabandeados no Brasil, tornam a dispersão de *P. bragai* complexa, não só no território brasileiro, mas também no exterior, com registros de aves infectadas na Índia, Reino Unido e outros países, (UNWIN et al., 2013, KUMAR et al., 2018).

Figura 3: Distribuição de *Paratanaisia bragai*. Fonte: Xavier (2015).



- ★ / ● Elevada prevalência /intensidade de infecção. (>80)
- ★ / ● Média prevalência/ intensidade de infecção. (>50<80)
- ★ / ● Baixa prevalência/ intensidade de infecção. (<50)
- Ocorrência.

Figura 4: Hospedeiros definitivos de *Paratanaisia bragai* descritos na literatura. A) *Columba livia*^a ; B) *Columbina talpacoti*^b; C) *Gallus gallus domesticus*^c; D) *Numida meleagris*^d; E) *Meleagris gallopavo*^e; F) *Phasianus colchicus*^f; G) *Ara ararauna*^g; H) *Propyrrhura maracana*^h; I) *Pyrrhura leucotis*ⁱ; J) *Rhynchotus rufescens*^j; K) *Lybius bidentatus*^k ; L) *Estrilda astrild*^l .

Fonte das imagens:

^a: Disponível em: <https://en.wikipedia.org/wiki/Rock_dove>. Acesso em: 24 Abr 2020.

^b: Disponível em: <<http://www.wikiaves.com/2375086>>. Acesso em: 24 Abr 2020.

^c: Disponível em: <https://plantsam.com/animals/gallus-gallus-domesticus/>. Acesso em: 24 Abr 2020.

^d: Disponível em: < https://en.wikipedia.org/wiki/Helmeted_guineafowl>. Acesso em: 24 Abr 2020.

^e: Disponível em: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Peru-selvagem>. Acesso em: 24 Abr 2020.

^f: Disponível em: < https://en.wikipedia.org/wiki/Common_pheasant>. Acesso em: 24 Abr 2020.

^g: Disponível em: <<https://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Ara-ararauna.jpg>>. Acesso em: 24 Abr 2020.

^h: Disponível em: <<http://www.wikiaves.com/2489859>> . Acesso em: 24 Abr 2020.

ⁱ: Disponível em: <<http://www.wikiaves.com/2040512>>. Acesso em: 24 Abr 2020.

^j: Disponível em: <<http://www.wikiaves.com/2039259>>. Acesso em: 24 Abr 2020.

^k: Disponível em: https://en.wikipedia.org/wiki/Double-toothed_barbet. Acesso em: 24 Abr 2020.

^l: Disponível em: <<http://www.wikiaves.com/1458703>> .Acesso em: 24 Abr 2020.



2.3 Hospedeiros intermediários

Os trematódeos digenéticos necessitam de um molusco como seu hospedeiro intermediário. Geralmente, a especificidade de trematódeos digenéticos para seu hospedeiro intermediário molusco é elevada, havendo inclusive mecanismos quimotáticos, como a presença de glicoconjugados no muco do molusco que são identificados pelos miracídios, atraindo-os para os moluscos da espécie adequada para seu estabelecimento e desenvolvimento larval intramolusco (BRANDOLINI, 2000).

Apesar desta referência a elevada especificidade na interação entre miracídios e moluscos hospedeiros, no que tange à *P. bragai*, encontramos na literatura referências a diferentes espécies de moluscos que atuam como hospedeiro intermediário para este trematódeo. Keller e Araújo (1992) realizaram a infecção experimental de *S. octona*, *Leptinaria unilamellata* e *Bradybaena similaris*, com ovos de *P. bragai*, obtendo êxito apenas nas infecções que utilizaram *L. unilamellata* como hospedeiro intermediário, evidenciando a capacidade de *P. bragai* utilizar moluscos desta espécie, de forma bem-sucedida, como hospedeiro em seu ciclo de vida. Tais autores, em 1993, reforçaram este papel de *L. unilamellata* como hospedeiro de *P. bragai* (ARAÚJO; KELLER, 1993). Brandolini e colaboradores (1997) obtiveram sucesso na infecção de moluscos de ambas as espécies, *L. unilamellata* e *S. octona*, com ovos de *P. bragai*.

Pinto e colaboradores (2004), observaram a infecção natural de rolinha-roxa (*Columbina talpacoti*), coletadas em área urbana do Rio de Janeiro, apontando como hospedeiros intermediários deste parasito, *S. octona* e *L. unilamellata*. Gomes e colaboradores (2005) coletaram faisões comuns (*Phasianus colchicus*) em onze diferentes localidades no município do Rio de Janeiro, com prevalência de 22% de infecção com *P. bragai*, também fazendo referência à *L. unilamellata* como um hospedeiro intermediário para este parasito.

Poucos estudos foram encontrados acerca do relacionamento entre *P. bragai* e seu hospedeiro intermediário molusco. Contudo, registros de aves naturalmente ou experimentalmente infectadas por este parasito, trazem referência a *L. unilamellata* e *S. octona* como hospedeiros intermediários efetivos para o estabelecimento e desenvolvimento do parasito (BRANDOLINI; AMATO, 2006; UNWIN et al., 2013; TAVELA et al., 2014; XAVIER et al., 2015).

2.3.1 Classificação taxonômica de *Subulina octona*

Esses animais pertencem ao filo Mollusca Linnaeus, 1758 e a classe Gastropoda Cuvier, 1797, a mais diversificada dentro deste filo e que possui os invertebrados melhor adaptados frente a variações de pressão da água, salinidade, umidade e temperatura (RUPPERT et al., 2005; BARBOSA, 1995). São moluscos pulmonados (subclasse Pulmonata) que fazem parte da ordem Stylommatophora e estão alocados na família Subulinidae Fischer & Crosse, 1877. Esta família possui três espécies com importância médica no Brasil, são elas: *S. octona*, *L. unilamellata* e *Rumina decollata* Linnaeus, 1758.

2.3.2 Morfologia geral e ecologia de *Subulina octona*

Araújo e Bessa (1993), ao estudarem a anatomia de *S. octona* na tentativa de esclarecer questões relacionadas à classificação taxonômica dessa espécie, verificaram que a concha desses animais é pequena (13x8mm) com a espira muito longa em decorrência do número de voltas (oito) (Figura 5). A abertura da concha possui forma ovalada sem dentes ou lamelas e com o perístoma cortante.

Subulina octona é um molusco terrestre que pode ser encontrado parcialmente ou totalmente enterrado (D'AVILA; BESSA, 2005), hermafrodita capaz de realizar autofecundação, possui hábito noturno e tem preferência por ambientes úmidos e sombreados como locais para repouso, alimentação, oviposição, estivação ou redução da atividade e comportamento agregativo (DURÇO et al., 2013). A alimentação é composta preferencialmente por vegetais que se fragmentam com facilidade, de vegetais em decomposição e do próprio solo (D'AVILA; BESSA, 2005).

A reprodução de *S. octona* ocorre durante todo o ano, preferencialmente na época das chuvas (ALMEIDA; MOTA, 2011). A oviposição ocorre em fendas no solo ou na lateral dos recipientes que os animais ocupam (BESSA; ARAÚJO, 1995a). Os ovos são esféricos, possuem coloração esbranquiçada e medem aproximadamente 2mm x 1.6mm, devido a dois achatamentos paralelos que possuem (ARAÚJO; BESSA, 1993).

Figura 5: Espécimes de *Subulina octona*. Fonte: Autora.



Subulina octona está amplamente distribuída, sendo encontrada na Europa, África, Austrália e Américas (SANTOS, 2012). No Brasil, essa espécie pode ser encontrada no Estado do Amapá, Amazonas, Rondônia, Pará, Ceará, Bahia, Rio de Janeiro, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul (ARAUJO; BESSA, 1993) (Figura 6).

Dentre os moluscos que atuam como hospedeiros intermediários de parasitos estudados no Brasil, verificamos a presença de *S. octona* como uma das espécies frequentemente registradas abrigando infecções naturais que possuem importância para a medicina humana e medicina veterinária (ARAUJO; BESSA, 1993).

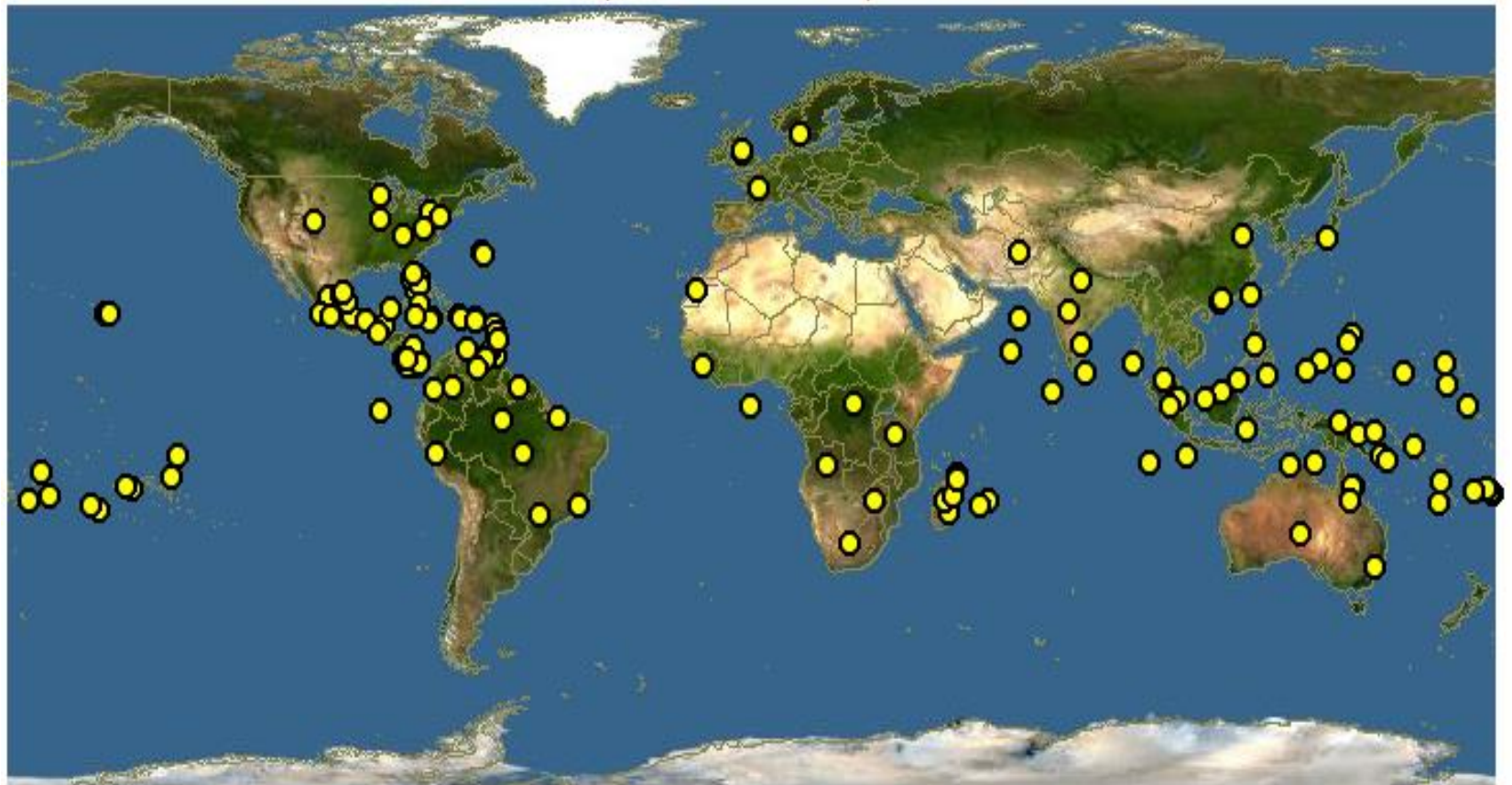
Encontramos registros na literatura de *S. octona* atuando como hospedeiro intermediário para *Platynosomum illiciens* (Braun, 1901) (Digenea, Dicrocoeliidae), um importante parasito de gatos domésticos (MALDONADO, 1945b); *Postharmostomum gallinum* Witenberg, 1923 (Digenea, Brachylaimidae), reconhecido parasito de aves domésticas (DUARTE, 1977); *Davainea proglottina* (Davaine, 1860) (Cestoda, Davaineidae) identificado como parasito de aves domésticas e pombos (VAN VOLKENBERG, 1937 *apud* MALDONADO, 1945a); *Aelurostrongylus abstrusus* (Railliet, 1898) (Nematoda, Angiostrongylidae) parasito de gatos; *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) 1905 (Nematoda, Angiostrongylidae), parasito de cães domésticos e carnívoros silvestres (BESSA et al., 2000) e *A. cantonensis* (Nematoda, Angiostrongylidae) parasito de ratos (CALDEIRA et al., 2007). Além disso, esse molusco foi descrito por Maldonado em 1945a como hospedeiro intermediário de *P. bragai* (Digenea, Eucotylidae).

A literatura encontrada referente à *S. octona* possui como principais focos: aspectos conquiliológicos, sinonímia, distribuição geográfica, aspectos morfológicos, histológicos e comportamentais (BESSA; ARAÚJO, 1995a; 1995b; ALMEIDA; MOTA, 2011; XAVIER, 2015). Além disso, foram realizadas pesquisas utilizando essa espécie como modelo para o desenvolvimento de moluscicidas (FERREIRA et al., 2009; SOUZA et al., 2012; NASCIMENTO et al., 2018a; NASCIMENTO et al., 2018b). Trabalhos com enfoque parasitológico também vem sendo desenvolvidos (BRANDOLINI et al., 1997; BRANDOLINI; AMATO, 2006; CALDEIRA et al., 2007). No entanto, verifica-se a carência de publicações que tenham como objetivo avaliar os efeitos da infecção por trematódeos

digenéticos sobre a reprodução e fisiologia dos moluscos, principalmente terrestres, que atuam como hospedeiros intermediários.

Figura 6: Distribuição geográfica de *Subulina octona*. Os pontos amarelos indicam os locais com registro do molusco. Fonte: Discover Life

<https://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Subulina+octona>



2.3.3 Relação molusco x trematódeo

Adema e Loker (1977) destacam que apesar da grande diversidade em espécies e da complexidade dos ciclos biológicos dos trematódeos digenéticos, todos apresentam moluscos como primeiro hospedeiro intermediário, sendo estes considerados indispensáveis para o desenvolvimento ontogênico desses parasitos.

A fase inicial do desenvolvimento dos trematódeos digenéticos, envolve um intenso processo de reprodução assexuada para a produção dos esporocistos de 1ª e de 2ª geração. Neste sentido, a localização na glândula digestiva do molusco é muito estratégica. Nesse sítio, os parasitos dispõem de espaço físico, suplementação de nutrientes, devido ao sistema circulatório semi-aberto, banhando assim toda a massa visceral do molusco e também por ser considerado um sítio não-letal, suportando intenso processo de destruição dos ácinos glandulares (VAN WEEL, 1974; BRANDOLINI; AMATO, 2006).

Moluscos apresentam mecanismos específicos, celular e humoral, de defesa. O sucesso do desenvolvimento de um trematódeo depende da estratégia que o helminto utiliza para escapar desse sistema (LIMA et al., 2016) e da capacidade do parasito para utilizar nutrientes do hospedeiro necessários para o seu metabolismo (TUNHOLI-ALVES et al., 2014), refletindo a coevolução entre o parasito e o hospedeiro intermediário.

A sobrevivência do trematódeo no molusco está relacionada com a capacidade que o helminto tem de incorporar antígenos do hospedeiro e não ser reconhecido como um corpo estranho (BASCH, 1976) ou interferir no sistema de defesa interno do molusco (LIE, 1982).

2.3.4 Parâmetros fisiológicos

Nos últimos anos, aspectos bioquímicos envolvendo a interação entre parasitos e seus hospedeiros têm recebido maior atenção. Neste sentido, várias investigações têm sido realizadas na tentativa de caracterizar o perfil metabólico e fisiológico do hospedeiro frente às infecções por diferentes parasitos (PINHEIRO; AMATO, 1995; FARO et al., 2013; LIMA et al., 2017). As infecções por trematódeos e nematoides resultam em alterações expressivas no estado metabólico e fisiológico de seus hospedeiros (BECKER, 1980).

2.3.4.1 Alterações reprodutivas em moluscos infectados

O parasitismo pode exercer influência sobre a atividade reprodutiva do molusco. De acordo com Baudoin (1975), as infecções em moluscos podem ocasionar a inibição total ou parcial da atividade reprodutiva, fenômeno reconhecido como castração parasitária total ou parcial, respectivamente. Tal fenômeno é resultado de ações físicas ou fisiológicas do parasito. Em ambos os casos, o parasito pode comprometer a gametogênese do hospedeiro, diretamente por ação mecânica ou indiretamente, através da drenagem de nutrientes da hemolinfa, de alterações endócrinas e da eliminação de produtos de excreção/secreção na hemolinfa. A castração parasitária pode ser frequentemente observada na associação entre moluscos e trematódeos (FARO et al., 2013).

Ao estudar a influência da infecção pelo trematódeo digenético *Eurytrema coelomaticum* (Giard et Billet, 1892) Looss, 1907 em *Bradybaena similaris* (Ferrusac, 1821), Pinheiro e Amato (1995) observaram a castração parasitária parcial dos moluscos. Segundo esses autores, a diminuição da atividade reprodutiva ocorreu devido à competição por nutrientes circulantes na hemolinfa do molusco entre o parasito e o molusco hospedeiro.

Faro e colaboradores (2013), observaram em *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 experimentalmente infectada por *Schistosoma mansoni* Sambon, 1917 que a castração parasitária parcial foi resultante da combinação de atividades mecânicas do parasito no tecido gonadal do molusco, principalmente no ovotestis, assim como por inanição dos caramujos causada pela ação parasitária das larvas de desenvolvimento. Essa combinação de mecanismos diretos e indiretos, segundo os autores, foram os agentes causadores da castração parasitária parcial.

No entanto, outro perfil reprodutivo no qual os moluscos aumentam os esforços reprodutivos na tentativa de minimizar perdas futuras, pode ser observado. Minchella (1985), denominou esse fenômeno de compensação da fecundidade.

Tunholi e colaboradores (2011) observaram que a infecção experimental de *B. glabrata* com diferentes cargas parasitárias de *E. paraensei* (5 e 50 miracídios) provocou um aumento significativo no esforço reprodutivo nos moluscos infectados pelo trematódeo, independente da carga parasitária utilizada, indicando a existência de um mecanismo compensatório do molusco frente a situações de estresse.

Dessa forma, nota-se que não há um padrão de alteração reprodutiva a ser seguido pelos moluscos infectados por trematódeos, indicando que as variações observadas nos aspectos reprodutivos de moluscos infectados são dependentes dos modelos utilizados, pois cada parasito é capaz de induzir alterações específicas em seus hospedeiros, que por sua vez responderão a essas alterações de maneira igualmente específica. Além disto, as alterações reprodutivas são dependentes de carga parasitária, da idade do hospedeiro, estado nutricional do molusco, fatores abióticos, como a modulação da enzima UDP-galactose 4-epimerase pelo fotoperíodo (van ELK; JOOSSE, 1981).

Os parâmetros frequentemente utilizados para caracterizar se há aumento ou diminuição da atividade reprodutiva dos moluscos são: número de ovos postos, número de posturas, número de ovos/molusco, número de posturas/molusco, número de ovos/posturas, número de ovos embrionados/molusco, número de moluscos eclodidos/molusco, sobrevivência dos jovens e conteúdo de galactogênio, dentre outros (LIMA et al., 2017).

A disponibilidade de galactogênio possui efeito direto na viabilidade dos embriões em desenvolvimento. Este polissacarídeo é o principal constituinte do fluido perivitelínico e atua como uma fonte energética para o embrião em desenvolvimento e para os moluscos recém eclodidos (GOMOT et al., 1989), o local de reserva deste carboidrato no molusco é a glândula de albúmen (THOMPSON; LEE, 1986).

2.3.4.2 Metabolismo de carboidratos em moluscos infectados

Uma vez dentro do molusco que irá atuar como hospedeiro intermediário, as larvas de trematódeos provocam mudanças no metabolismo do hospedeiro, pois passam a competir diretamente por nutrientes e utilizá-los para o seu desenvolvimento larval, causando no molusco um estado nutricional semelhante ao observado durante períodos de jejum severo (PINHEIRO, 1996). Além disso, os parasitos também podem alterar a composição da hemolinfa, através da liberação de seus produtos de excreção/secreção (BECKER, 1980).

Os níveis de glicose são regulados através de mecanismos fisiológicos integrados na tentativa de manter as variações glicídicas compatíveis com a manutenção da vida do molusco em situações adversas, como infecções ou estresse (THOMPSON; LEE, 1986).

Tunholi e colaboradores (2011), verificaram que a interação do hospedeiro intermediário com os helmintos pode causar uma diminuição da atividade metabólica dos moluscos hospedeiros, que passam a usar suas reservas metabólicas para manter as funções vitais, assim como para suprir as necessidades energéticas das larvas durante seus estágios de desenvolvimento.

Um mecanismo frequentemente usado pelos moluscos na tentativa de manter a normoglicemia da hemolinfa é a utilização de reservas glicídicas armazenadas sob a forma de glicogênio. Essas reservas estão localizadas na glândula digestiva e no tecido muscular do molusco, preferencialmente (PINHEIRO et al., 2009; PINHEIRO; AMATO, 1994).

O glicogênio assume grande importância na manutenção do estado energético uma vez que a partir da sua degradação ocorre a liberação de metabólitos que rapidamente podem ser convertidos em glicose livre. Assim, a glicose disponível na hemolinfa será degradada para promover a síntese de energia realizada em duas etapas. A primeira etapa é a glicólise, uma via ancestral, portanto, nela se dá a degradação anaeróbia da glicose até a formação de piruvato. Em condições aeróbicas, o piruvato será transportado para o interior da mitocôndria e convertido em Acetil CoA através da atuação do complexo piruvato desidrogenase (PDH), sendo incorporado ao ciclo do ácido cítrico (NELSON; COX, 2018).

Massa e colaboradores (2007), ao estudarem os efeitos da infecção por *S. mansoni* no metabolismo de *B. glabrata*, verificaram que a transição do metabolismo aeróbio para o anaeróbio altera a concentração de alguns ácidos orgânicos (ácido oxálico, pirúvico e succínico), tanto na hemolinfa quanto na glândula digestiva. Outro parâmetro que indica essa mudança metabólica é atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH), responsável por reduzir o piruvato em ácido láctico, garantindo a realização do metabolismo anaeróbio para produção de energia e reoxidação do NADH.

2.3.4.3. Metabolismo de proteínas

Os moluscos utilizam carboidratos como principal fonte energética para a manutenção dos processos metabólicos e reprodutivos. No entanto, quando expostos às condições de stress, como a estivação e o parasitismo por larvas de trematódeos, outros substratos podem ser usados para a mesma finalidade (PINHEIRO et al., 2001). Como consequência da competição

pelas fontes glicídicas e na tentativa de manter o equilíbrio homeostático, reações emergenciais podem ser observadas, tais como a utilização de proteínas como substrato energético.

Para serem utilizados como fonte energética, os aminoácidos são desmembrados em um esqueleto carbônico e um grupo NH_4^+ . Porém, o efeito da utilização do esqueleto carbônico de aminoácidos faz com que o molusco precise lidar com aumentos nos conteúdos de ureia, ácido úrico e amônia, que são seus produtos nitrogenados de excreção (PINHEIRO et al., 2009).

A amônia produzida neste processo pode ser destinada à formação de novos aminoácidos, aminas biológicas e nucleotídeos; ou ainda ser desviada para formação de carbamoil fosfato e entrar no ciclo da ornitina. Caso o grupamento NH_4^+ seja endereçado para formação de nucleotídeos, esta síntese ocorre pela via das purinas, tendo como um dos seus produtos o ácido úrico. Porém, se o destino for à formação de carbamoil fosfato, o grupamento nitrogenado entra no ciclo da ornitina e é excretado na forma de ureia (NELSON; COX, 2011).

As aminotransferases são um grupo de enzimas que catalisam a interconversão dos aminoácidos em α -cetoácidos através da transferência de grupos amina. Sendo assim, essas enzimas possuem papel fundamental na gliconeogenese, pois haverá a produção de carboidratos através da utilização do esqueleto carbônico proveniente dos aminoácidos. Além disso, as aminotransferases são indicadores de lesão tecidual (PINHEIRO et al., 2001).

2.3.4.4. Metabolismo de cálcio

Gastropodes terrestres estocam grandes quantidades de sais de cálcio, que são depositados principalmente, na concha e nos tecidos da glândula digestiva, permitindo uma grande capacidade de mobilização e intercâmbio de cálcio entre estes dois sítios (PASCHOAL; AMATO, 1996; MAGALHÃES et al., 2011). Esse mineral apresenta importância singular para os moluscos, pois poucos animais têm sua ecologia tão intimamente ligada a um único elemento que, direta ou indiretamente, determina sua distribuição, resposta a condições ambientais adversas, capacidade de estivação, estivação e cópula, taxa de crescimento e capacidade reprodutiva (BEEBY; RICHMOND, 2007). O processo reprodutivo

dos moluscos necessita de uma grande quantidade de cálcio, principalmente para a formação da casca do ovo e da concha embrionária (WILBUR; TOMPA, 1979).

Além disso, os moluscos utilizam carbonato de cálcio para neutralizar produtos tóxicos resultantes da aceleração da via glicolítica, que possuem como produtos finais ácidos orgânicos, que ao serem liberados na hemolinfa, representam risco para o molusco à medida que são capazes de gerar alterações consideráveis no pH da mesma (SILVA et al., 2019).

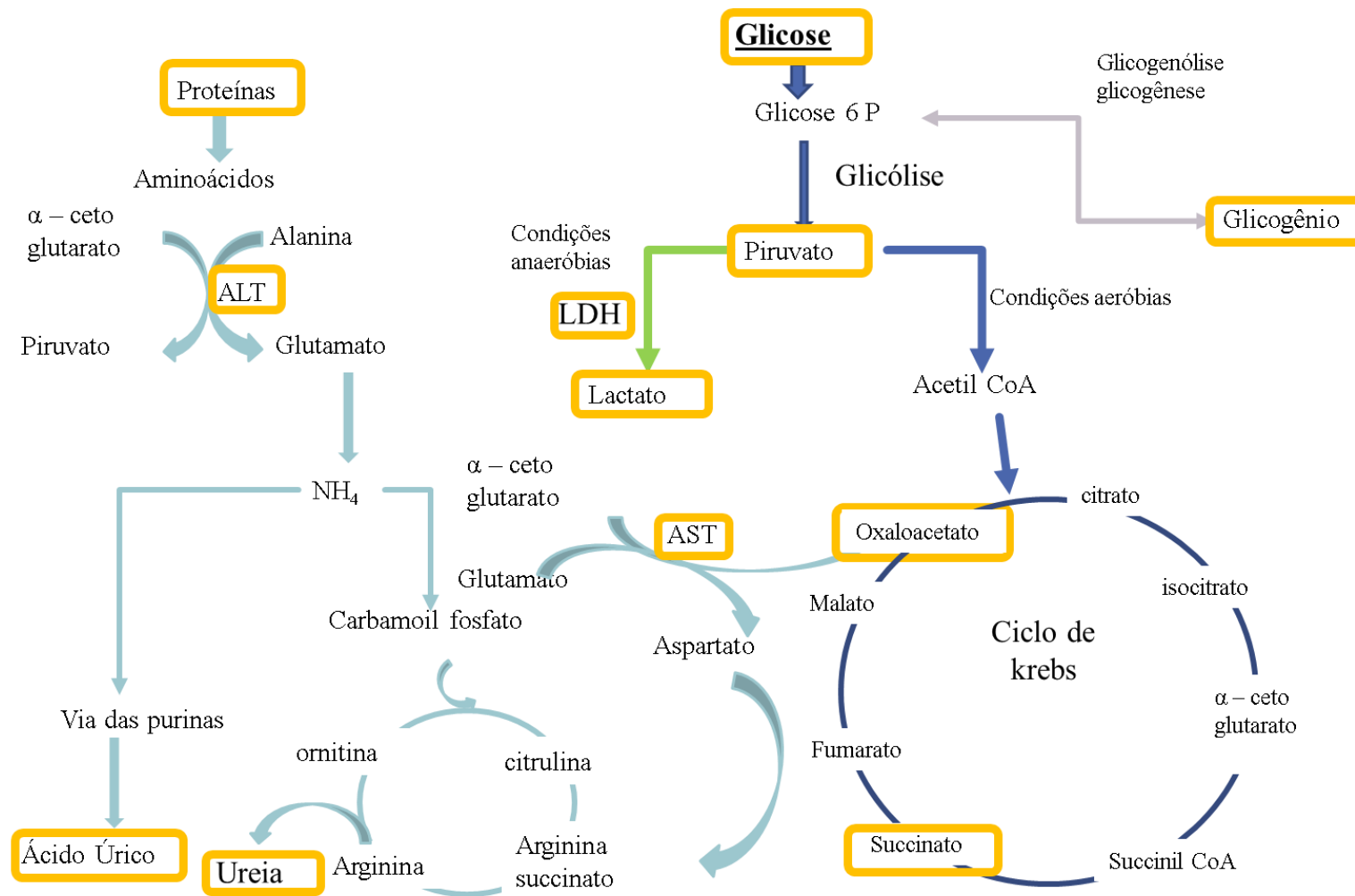
2.3.4.5 Mapa metabólico

O mapa metabólico (Figura 7) elucida as vias metabólicas utilizadas pelo molusco e avaliadas no presente estudo.

Em condições normais, a glicose segue através da glicólise para a formação de duas moléculas de piruvato, que irão para o ciclo de Krebs gerando energia e mantendo o balanço redox. A glicose circulante pode ser estocada sob a forma de glicogênio através de um processo conhecido como glicogênese. Já em condições adversas, o piruvato produzido pela glicólise pode seguir através de uma via fermentativa, dessa forma, ocorre a conversão de piruvato em lactato pela enzima lactato desidrogenase. Além disso, caso a quantidade de glicose circulante esteja reduzida, o glicogênio presente nos tecidos de reserva pode ser quebrado para a liberação de monômeros de glicose na tentativa de manter a homeostase, processo conhecido como glicogenólise.

A gliconeogênese também pode ocorrer através do uso de proteínas como substrato energético. Caso esse processo ocorra, haverá o aumento da atividade das aminotransferases e a produção de maiores quantidades de amônia, que pode seguir pela via das purinas ou ciclo da ornitina produzindo ácido úrico e ureia, respectivamente.

Figura 7: Mapa metabólico de *Subulina octona* com a indicação dos parâmetros analisados no presente estudo (em amarelo). Fonte: Autora.



3 METODOLOGIA GERAL

3.1 Obtenção e criação de *Subulina octona*

Os moluscos foram obtidos através de coletas manuais realizadas nas proximidades do Anexo II do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) (Latitude: -22,7634; Longitude: -43,6882). Posteriormente, os animais adultos coletados foram levados para o Laboratório de Biofísica do Departamento de Ciências Fisiológicas (ICBS/UFRRJ). Esses moluscos foram acomodados em terrários (20 cm de comprimento x 12 cm de largura x 6 cm de altura), previamente cobertos por uma camada de aproximadamente 2cm de terra vegetal esterilizada em estufa à 120 °C durante 1 hora e umedecida com água destilada. Foram formados dois terrários com moluscos adultos coletados no campo, em cada terrário foram alocados 50 moluscos (densidade de 0,035 moluscos/cm³).

Os moluscos foram alimentados *ad libitum* com folhas alface (*Lactuca sativa* L.) frescas, e legumes frescos descascados e laminados (0,05 mm de espessura x 6 cm de comprimento): cenoura (*Daucus carota* L.), pepino (*Cucurbita pepo* L.) e chuchu (*Sechium edule* (Jacq.) Swartz, 1800). Além disso, a alimentação foi suplementada com ração para crescimento de aves peneirada (tendo a peneira 1 mm de malha) e enriquecida com carbonato de cálcio (CaCO₃), na proporção 3:1 (BESSA; ARAUJO, 1995) servida em fundos de copo plástico de café (3,3 cm de diâmetro x 0,3 cm de altura).

A manutenção dos terrários foi feita duas vezes por semana, onde a alimentação oferecida era trocada, os animais mortos eram removidos e os filhotes presentes nos terrários eram retirados e acomodados em novos terrários (montados como descrito previamente) até atingirem a atividade reprodutiva, confirmada pela observação da presença de ovos através da transparência da concha e com conchas de comprimento superior à 10 mm medidas em paquímetro universal, com capacidade para 200mm e resolução de 0,05mm (Marca Mitutoyo, modelo 530-114BR). Somente após atingir esses parâmetros, os moluscos foram utilizados nesse estudo.

3.2 Obtenção dos ovos de *Paratanaisia bragai*

Pombos (*Columba livia* Gmelin, 1789) naturalmente infectados e coletados no município de Seropédica, RJ, Brasil em 2018 (Latitude: 22° 44' 29" Sul, Longitude: 43° 42' 19" Oeste, Altitude: 36m) foram submetidos a exames de fezes, através do método de sedimentação de Ritchie (DE CARLI, 1994), para verificação da infecção. Os pombos infectados foram necropsiados para a retirada dos rins, que foram transferidos para placas de Petri contendo solução fisiológica de cloreto de sódio (NaCl) 0,85%, onde permaneceram até serem seccionados com uma lâmina de bisturi, para a coleta dos parasitos dos ductos renais. Após a secção, os helmintos adultos foram recuperados e transferidos para uma placa de Petri contendo solução fisiológica 0,85%, e sob microscópio estereoscópico onde foram dilacerados para obtenção dos ovos (BRANDOLINI, 2000; XAVIER, 2015). Os ovos obtidos foram transferidos para um vidro de relógio contendo água destilada onde foram mantidos até a utilização na infecção. Os procedimentos experimentais utilizados foram aprovados pela Comissão de Ética Sobre o Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Veterinária (IV) da UFRRJ (Processo nº 2225230617) (ANEXO).

3.3 Infecção experimental

Os moluscos selecionados para a infecção passaram por um período de privação alimentar de 24 horas, seguida pela exposição aos ovos do trematódeo (Figura 1).

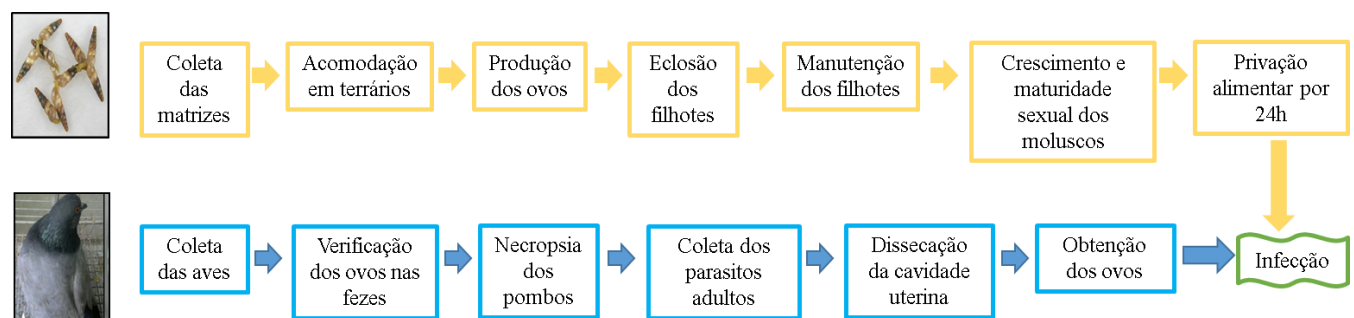


Figura 1: Esquema para a obtenção dos moluscos *Subulina octona* e dos ovos de *Paratanaisia bragai* para a realização da infecção experimental.

Um total de 432 exemplares de *S. octona* foram expostos individualmente aos ovos do parasito *P. bragai* em placas para cultura de células com 24 poços (Tap®), em cada poço foi colocado um pedaço pequeno de chuchu e 20 ovos do parasito em 20µl água destilada (por amostragem). Os moluscos permaneceram nessas condições durante 24 horas. Os grupos controle, formados por 432 moluscos não expostos aos ovos do parasito, também foram colocados em placas para cultura de células com 24 poços (Tap®) contendo um pedaço de chuchu e 20 µl de água destilada durante 24 horas.

Após a exposição aos ovos do parasito, os moluscos passaram a ser designados como “moluscos infectados” e foram divididos em 4 grupos contendo 100 animais cada de acordo com a quantidade de dias pós infecção (10, 20, 30 e 40 dias pós infecção - d.p.i.). Foi formado um grupo contendo 32 moluscos com o objetivo de substituir os moluscos mortos durante o período de observação, mantendo a densidade populacional nos terrários. Os moluscos controle foram divididos seguindo os mesmos critérios. O estudo utilizou um total de 864 moluscos (n=864).

Após a divisão dos moluscos em oito grupos (4 grupos controle e 4 grupos infectados) contendo 100 moluscos cada de acordo com os dias pós infecção, esses animais foram novamente divididos para a acomodação nos terrários. Dessa forma, cada terrário continha 50 moluscos (densidade populacional igual a 0,035 moluscos/cm³), 2cm de terra vegetal esterilizada em estufa à 120 °C durante 1 hora e umedecida com água destilada durante o período experimental (Figura 2).

Os grupos formados nesse item, foram utilizados para a obtenção dos resultados numéricos da biologia reprodutiva (número de ovos no trato reprodutivo, numero de moluscos eclodidos), coleta de tecidos para a análise histológica e histoquímica (ovotestis, glândula digestiva e massa cefalopediosa), coleta de tecidos para a extração e quantificação de carboidratos (glândula de albúmen, massa cefalopediosa, glândula digestiva), coleta de hemolinfa e coleta de concha.

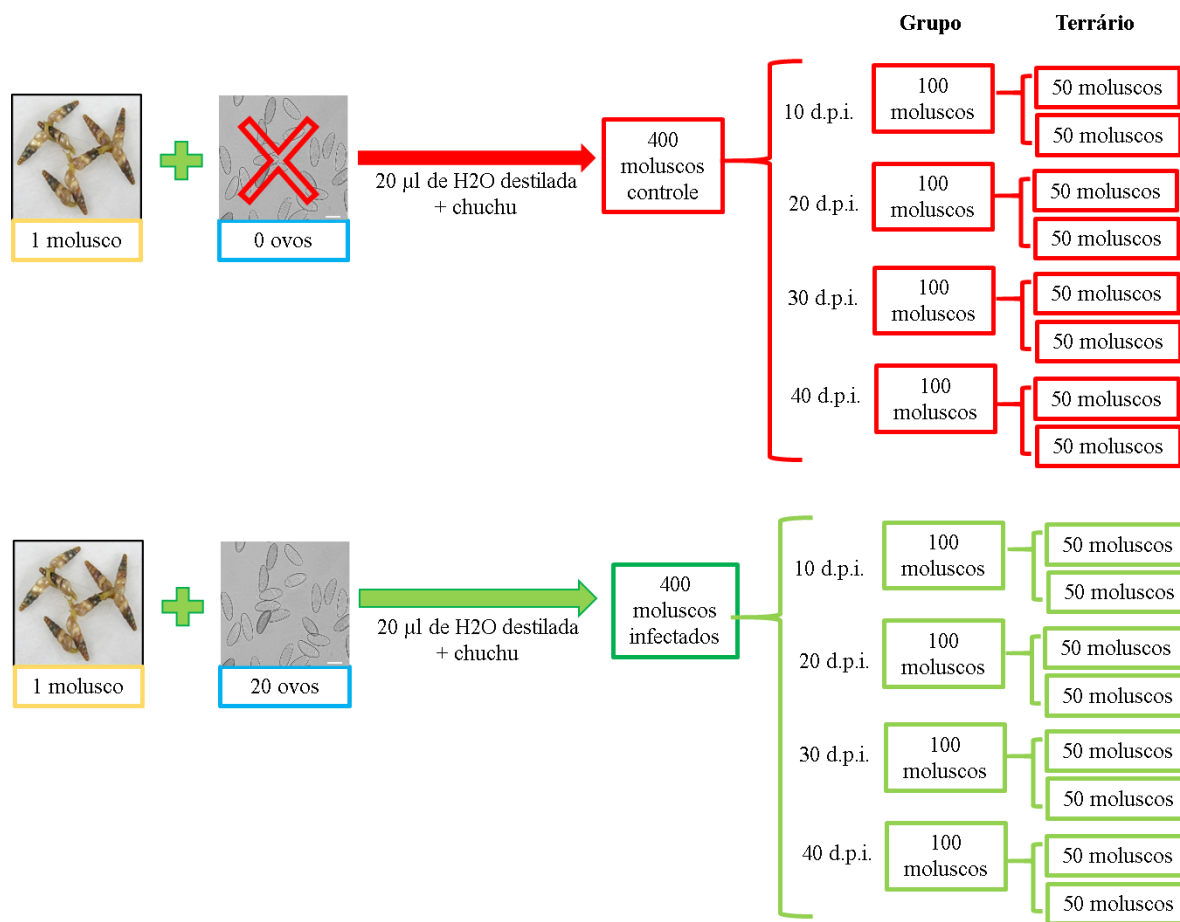


Figura 2: Esquema da divisão dos moluscos *Subulina octona* em grupo controle (não infectados – em vermelho) e infectados pelo trematódeo *Paratanaisia bragai* (verde), sua divisão em grupos e nos terrários.

Estudos prévios foram realizados e serviram de base para a determinação da carga parasitária e da quantidade de moluscos necessária para fornecer material biológico para a realização das análises propostas. Com base na análise dos resultados obtidos a partir dos estudos prévios e nos resultados obtidos no estudo de Tunholi e colaboradores (2011) que avalia o efeito de cargas miracidiais diferentes (5 e 50 miracídeos) sob os aspectos reprodutivos de *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 infectada por *Echinostoma paraensei* Lie e Basch, 1967, a carga parasitária utilizada foi de 20 ovos de *P. bragai* por molusco, embora Brandolini e Amato (2006) tenham obtido sucesso na infecção usando uma carga parasitária de 5 ovos por molusco.

CAPÍTULO I

AVALIAÇÃO DO PERFIL REPRODUTIVO DE *SUBULINA* *OCTONA* (GASTROPODA, SUBULINIDAE) EXPERIMENTALMENTE INFECTADA POR *PARATANAISIA BRAGAI* (DIGENEA, EUCOTYLIDAE)

RESUMO

A infecção por trematódeos digenéticos pode causar alterações na atividade reprodutiva dos moluscos que atuam como hospedeiros intermediários. Porém, estas alterações variam conforme os seguintes parâmetros: as espécies de moluscos e de parasito envolvidas, idade do hospedeiro, carga parasitária infectante, fatores abióticos e bióticos. O objetivo foi verificar as alterações reprodutivas em *Subulina octona* após a infecção por *Paratanaisia bragai*. Os moluscos infectados foram expostos individualmente durante 24 horas a 20 ovos do parasito e quatro grupos foram formados (10, 20, 30 e 40 dias pós infecção – d.p.i.), grupos controle contendo moluscos não infectados também foram formados. A cada 10 dias, o número de ovos no trato reprodutivo, o número de filhotes eclodidos, o conteúdo de galactogênio e as alterações histopatológicas foram avaliadas. Aos 10 e 40 d.p.i., foram observadas reduções significativas do número de ovos no trato reprodutivo por molusco nos moluscos infectados ($3,11 \pm 0,20$; $4,95 \pm 0,12$, respectivamente) em relação ao controle ($4,78 \pm 0,12$; $5,22 \pm 0,07$, respectivamente). Em relação ao número de moluscos eclodidos por molusco, houve uma redução significativa aos 40 d.p.i. nos moluscos infectados ($0,80 \pm 0,01$) em relação ao controle ($1,2 \pm 0,01$). Aumentos significativos foram observados no conteúdo de galactogênio aos 20 e 30 d.p.i, porém aos 40 d.p.i. verificou-se uma redução significativa nos moluscos infectados ($79,60 \pm 0,31$; $93,55 \pm 0,62$ e $74,12 \pm 0,29$, respectivamente) em relação aos moluscos controle ($67,59 \pm 2,54$; $79,23 \pm 1,86$ e $79,78 \pm 0,60$, respectivamente). A análise da regressão polinomial de terceira ordem mostrou oscilações entre os intervalos analisados e, ao sobrepor essas curvas, verificou-se um comportamento inverso na comparação dos parâmetros estudados. Em relação à quantidade de galactogênio, os moluscos controle e infectados seguem padrões semelhantes de variação. A análise histológica evidenciou a presença de gametas masculinos e femininos, porém com acentuada redução no número de oócitos. Os resultados obtidos evidenciaram que a biologia reprodutiva do hospedeiro foi afetada pelo desenvolvimento intramolusco do parasito.

Palavras-chave: trematódeo digenético, relação parasito-hospedeiro, padrões reprodutivos.

ABSTRACT

Digenetic trematode are responsible for changes in the reproductive profile of snails, which are intermediate hosts. However, these changes vary according to the species of snail and parasite involved, age of the host, infective parasite load, abiotic and biotic factors. Our aim was verify the reproductive alterations in *Subulina octona* after infection by *Paratanaisia bragai*. The infected snails were individually exposed for 24 hours to 20 parasite eggs and four groups were formed (10, 20, 30 and 40 d.p.i. – days post infection), along with control groups. Reproductive features such as the number of eggs in the reproductive tract, number of eggs hatched, galactogen content and histopathological changes were evaluated every 10 days. The regression analysis of the reproductive parameters indicated the inversion of the observed patterns for the number of eggs per snail and of eggs hatched during the experimental period between the control and infected snails, reaching maximum reductions of 10.94% and 33.3%, respectively. However, in relation to the amount of galactogen, the two groups followed the same pattern of variation, being 17.77% and 18.07% higher than in the control snails at 20 and 30 d.p.i., respectively. In the histology, we observed the presence of male and female gametes with marked reduction in the number of oocytes. The results showed that the intra-snail development of the parasite affects the reproductive biology of the host.

Key words: digenetic trematode; host-parasite relationship; reproductive patterns.

1 INTRODUÇÃO

Paratanaisia bragai (Santos, 1934) é um trematódeo digenético com ciclo de vida heteroxeno, que possui moluscos atuando como hospedeiros intermediários e aves domésticas e silvestres como hospedeiros definitivos. A infecção do hospedeiro definitivo ocorre através da ingestão de moluscos contendo as metacercárias, que se desenvolvem até o estágio adulto nos ductos renais das aves (SANTI et al., 2017). Ao parasitar as aves, *P. bragai* pode causar sintomas macro e microscópicos (XAVIER et al., 2015). Moluscos adquirem a infecção através da ingestão dos ovos liberados nos produtos de excreção das aves infectadas.

A presença desse trematódeo foi registrada na América do Sul, América Central, Oceania e Ásia (KELLER; ARAUJO, 1992; KUMAR et al., 2009). Muitos autores têm registrado a presença de espécies de *Paratanaisia* em diferentes aves na Índia (MOUDGIL et al., 2017; MALIK et al., 2016; BORAH et al., 2009), Costa Rica (ALFARO-ALARCÓN et al., 2015), Egito (ABDO; SULTAN, 2013) e Reino Unido (UNWIN et al., 2013).

No Brasil, foram encontrados registros da ocorrência de *Paratanaisia* spp. em vários estados, como o Paraná (TARODA et al., 2013), São Paulo (SANTI et al., 2018; SANTI et al., 2017; SILVA et al., 2016; LUPPI et al., 2007) e Minas Gerais (TEODORO et al., 2018; TAVELA et al., 2014). A maioria desses registros envolvem aves que receberam cuidados em hospitais veterinários, zoológicos ou triagem de animais selvagens e centros de conservação. Esses registros mostram a frequência elevada de aves de diferentes espécies infectadas com *P. bragai*, e os registros de infecção são feitos, geralmente, em decorrência de patologias surgidas com evidentes sinais clínicos ou em exames *post mortem*. Gomes e colaboradores (2005) evidenciaram frequência de infecção de 22% em faisões coletados em diferentes localidades no Rio de Janeiro, RJ. Considerando o hábito de criação de aves domésticas, sejam como animais de companhia ou como criações de subsistência, a grande dispersão de pombos em nossas cidades, o elevado índice de contrabando de aves, sobretudo selvagens, fica evidente a destacada importância veterinária dos trematódeos do gênero *Paratanaisia* para a vida selvagem e sua conservação.

Adicionalmente, a taxonomia do gênero *Paratanaisia* (Santos, 1934) Freitas, 1959 tem sido objeto de muitas investigações desde a sua descrição. Até o momento, o gênero

Paratanaisia está classificado na família Eucotilydae Cohn, 1904 e subfamília Tanaisiinae Freitas, 1951 (KANEV et al., 2002). No entanto, ainda existe a necessidade de uma revisão sistemática onde dados moleculares e descrição de estruturas morfológicas possam delinear melhor as espécies de Eucotilydae, e melhor caracterizar *P. bragai* (SANTI et al., 2018). Devido à ampla distribuição geográfica deste trematódeo, é importante entender as características inerentes à relação entre o parasito e os moluscos que atuam como hospedeiros intermediários. Isso permitirá esclarecer a dinâmica ecológica e populacional de *P. bragai*.

O ciclo biológico deste parasito foi estudado por Maldonado (1945), Keller e Araújo (1992) e Brandolini e Amato (2006), indicando os moluscos terrestres *Subulina octona* (Brugüiere, 1789) e *Leptinaria unilamellata* (d'Orbigny, 1835) como hospedeiros intermediários no Brasil. Essas espécies de moluscos pertencem à família Subulinidae e são encontrados em ambientes úmidos e sombreados, como jardins e hortas (ARAÚJO; BESSA, 1993). São animais hermafroditas e considerados pragas agrícolas (BOFFI, 1979).

Um importante aspecto que confere notoriedade a *S. octona* é o seu envolvimento como hospedeiro intermediário no ciclo biológico de parasitos que possuem relevância médica e veterinária (DURÇO et al., 2013). Ferreira e Almeida (2003) indicaram esse molusco como hospedeiro intermediário do trematódeo *Platynosomum fastosum* – sin *P. concinnum* (Bielsa & Greiner, 1985), considerado o parasito hepático mais importante em gatos domésticos. Em adição, esse molusco também pode atuar como hospedeiro intermediário do nematoide *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935), o agente etiológico da angiostrongilíase neural, uma zoonose com importância médica e veterinária, que possui roedores como hospedeiros definitivos. Além disso, humanos podem adquirir a doença através da ingestão de hospedeiros intermediários ou paratênicos infectados contendo larvas de terceiro estágio (L3) (WANG et al., 2008; CALDEIRA et al., 2007).

Infecções por larvas de trematódeos podem alterar a atividade reprodutiva dos moluscos hospedeiros. Essas mudanças são frequentemente determinadas através da observação de parâmetros relacionados à oviposição e viabilidade dos ovos postos (TUNHOLI-ALVES et al., 2011). Associados a esses parâmetros, outros indicadores também podem ser avaliados para compreender melhor essas mudanças, como, por exemplo, a análise

do conteúdo de galactogênio e a análise de possíveis alterações histopatológicas nos tecidos gonadais do molusco (BRANDOLINI, 2000).

Galactogênio é um homopolímero de galactose, sintetizado na glândula de albúmen, como parte constituinte do fluído perivitelínico, o qual é depositado dentro dos ovos em formação para nutrir os embriões durante o seu desenvolvimento e os moluscos recém eclodidos (GOMOT et al., 1989).

Tunholi e colaboradores (2011) verificaram a compensação da fecundidade em *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 experimentalmente infectada com doses de 5 e 50 miracídios de *Echinostoma paraensei* (Lie & Basch, 1967), conforme fenômeno caracterizado por Minchella (1985). De acordo com este autor, o animal infectado pode aumentar os seus esforços reprodutivos para compensar perdas futuras.

No entanto, a infecção por trematódeos pode diminuir a atividade reprodutiva dos moluscos, como observado por Pinheiro e Amato (1995) ao avaliar os efeitos da infecção por *Eurytrema coelomaticum* (Giard e Billet, 1892) Looss, 1907 em *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821), onde o fenômeno da castração parasitária relatado por Baudoin (1975) foi observado. De acordo com esse autor, o molusco pode sofrer a total ou parcial redução da atividade reprodutiva, resultante de uma ação mecânica direta do parasito nas estruturas reprodutivas ou de ação indireta associada com a diminuição das reservas energéticas do molusco e alterações neuroendócrinas.

As mudanças na atividade reprodutiva de moluscos frente a infecções por larvas de trematódeos digenéticos têm sido amplamente estudadas, principalmente em moluscos aquáticos pertencentes à família Planorbidae (CREWS; YOSHINO, 1990; TUNHOLI et al., 2011; FARO et al., 2013). No entanto, há escassez de dados na literatura sobre as respostas acerca da fisiologia reprodutiva de moluscos terrestres em decorrência da infecção por larvas de trematódeos (PINHEIRO; AMATO, 1995).

Alterações reprodutivas podem ser influenciadas por fatores bióticos e abióticos, tais como a nutrição, densidade populacional, idade do molusco, intensidade da infecção do parasito, isolado do parasito e do molusco, umidade, temperatura, fotoperíodo (SANDLAND; MINCHELLA, 2003; TUNHOLI et al., 2011, BRANDOLINI; GOMES, 2002).

Considerando a importância de analisar os aspectos reprodutivos de moluscos infectados para entender a dinâmica da interação parasito-hospedeiro, o objetivo desse estudo foi verificar as alterações reprodutivas causadas pelo parasitismo por *P. bragai* no molusco terrestre *S. octona* através da avaliação dos parâmetros reprodutivos (número de ovos eclodidos/molusco e número de ovos no trato reprodutivo/molusco), quantificação do conteúdo de galactogênio e análise histopatológica dos moluscos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A obtenção dos moluscos aptos para a infecção e dos ovos do parasito foi realizada como descrito previamente no item 3 Metodologia Geral, encontrada na página 31.

2.1 Coleta e processamento das amostras

Os moluscos foram acompanhados durante 40 dias após a infecção. A cada 10 dias, foi realizada a contagem do número de filhotes e do número de ovos em formação no trato reprodutivo dos moluscos. Finalizada a contagem, os moluscos foram dissecados, sem anestesia para a coleta das glândulas de albúmen sob banho de gelo, as quais foram pesadas em balança digital analítica (Bel®), identificadas e armazenadas em microtubo eppendorf a -20°C para posterior análise do conteúdo de galactogênio. O conteúdo de galactogênio presente na glândula de albúmen foi determinado de acordo com Pinheiro e Gomes (1994) e Sumner (1924) e os resultados foram expressos em mg galactose/g tecido, peso fresco.

Aos 10, 20, 30 e 40 dias pós infecção, três moluscos de cada grupo (infectado e controle) foram dissecados e colocados no fixador Duboscq-Brasil modificado (etanol 80°GL – 600 ml + formalina comercial – 250 ml + ácido acético glacial – 150 ml) (FERNANDES, 1949) durante 48h para a realização da análise histológica e, posteriormente transferidos para álcool 70%, onde foram mantidos até o processamento. O processamento foi realizado pela técnica histológica de rotina (TOLOSA et al., 2003) no Laboratório de Técnicas Histológicas do Departamento de Biologia Animal da UFRRJ. Cortes seriados com 5µm de espessura foram obtidos. O material foi corado com tricrômico de Gomori. O material foi observado sob o microscópio Olympus BX51®, e as imagens foram capturadas com o software Olympus CellSens Standard (CS-ST-V1, CellSens Standard, v.1.00) ®.

2.2 Análise estatística

Os resultados numéricos da análise reprodutiva foram expressos como média ± erro padrão da média e o grupo controle foi comparado com o grupo infectado através do teste t para dados não pareados ($\alpha=5\%$). A relação entre o tempo de infecção e os parâmetros reprodutivos foi determinada pela análise de regressão polinomial de terceira ordem (InStat, GraphPad, V.4.00, Prisma, GraphPad, v.3.02, Prisma Inc.)

3 RESULTADOS

A média total do número de ovos observados no trato reprodutivo por molusco durante o período experimental foi de 18,64 para o grupo controle e 16,66 para o grupo infectado, representando uma redução de 10,62% nesse parâmetro como consequência da infecção.

Dez dias após a infecção, os moluscos infectados ($3,11 \pm 0,20$) mostraram uma redução significativa em 34,94% no número de ovos observados no trato reprodutivo em comparação com o grupo controle ($4,78 \pm 0,12$). Aos 20 d.p.i., o oposto foi observado, houve um aumento em 5,6% desse parâmetro nos moluscos infectados ($4,34 \pm 0,15$) em relação aos moluscos controle ($4,11 \pm 0,16$). A partir desse ponto, o número de ovos diminuiu novamente em 5,96% decorridos 30 d.p.i. ($4,26 \pm 0,17$) e 5,17% após 40 d.p.i. ($4,95 \pm 0,12$), respectivamente, comparado ao grupo controle avaliado no mesmo período ($4,53 \pm 0,16$; $5,22 \pm 0,07$). Redução significativa foi observada no grupo infectado após 40 dias pós infecção em comparação ao grupo controle (Tabela 1).

Reduções foram observadas em 10,07%, 30,48% e 33,33% no número de moluscos eclodidos/molusco quando analisamos os animais infectados aos 10 d.p.i. ($2,50 \pm 0,27$), 20 d.p.i. ($1,3 \pm 0,24$) e 40 d.p.i. ($0,80 \pm 0,01$), comparado com os grupos controle analisados no mesmo período ($2,78 \pm 0,24$, $1,87 \pm 0,34$ e $1,2 \pm 0,01$, respectivamente). Apenas os moluscos analisados após 40 dias de exposição apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle. No entanto, um aumento de 12,04% foi observado nos moluscos infectados aos 30 d.p.i. ($3,07 \pm 0,84$) quando comparados aos moluscos controle ($2,74 \pm 1,35$) (Tabela 1).

O mesmo padrão oscilatório foi observado em ambos os grupos quando realizada a análise da relação entre o número de moluscos eclodidos e o tempo de infecção (controle e infectado), apresentando uma relação negativa entre esses parâmetros. A relação entre esses parâmetros para moluscos infectados ($r^2=0,49$) não foi significativa, porém foi verificada uma forte relação para os moluscos controle ($r^2=0,91$) (Figura 1A).

Tabela 1: Efeitos da infecção experimental por *Paratanaisia bragai* sobre os parâmetros reprodutivos, expressos em média $\pm$ erro padrão da média ($\bar{X} \pm \text{EPM}$), do molusco *Subulina octona*, seu hospedeiro intermediário, ao longo de 40 dias pós infecção (d.p.i.).

Tempo de infecção (d.p.i.)	Ovos no trato reprodutivo/molusco $\bar{X} \pm \text{EPM}$		Moluscos eclodidos/molusco $\bar{X} \pm \text{EPM}$		Galactogênio (mg de galactose/g de tecido, peso fresco) $\bar{X} \pm \text{EPM}$	
	Controle	Infectado	Controle	Infectado	Controle	Infectado
10	4,78 $\pm$ 0,12 ^a	3,11 $\pm$ 0,20 ^b	2,78 $\pm$ 0,24 ^a	2,50 $\pm$ 0,27 ^a	65,34 $\pm$ 3,84 ^a	63,65 $\pm$ 1,52 ^a
20	4,11 $\pm$ 0,16 ^a	4,34 $\pm$ 0,15 ^a	1,87 $\pm$ 0,34 ^a	1,3 $\pm$ 0,24 ^a	67,59 $\pm$ 2,54 ^a	79,60 $\pm$ 0,31 ^b
30	4,53 $\pm$ 0,16 ^a	4,26 $\pm$ 0,17 ^a	2,74 $\pm$ 1,35 ^a	3,07 $\pm$ 0,84 ^a	79,23 $\pm$ 1,86 ^a	93,55 $\pm$ 0,62 ^b
40	5,22 $\pm$ 0,07 ^a	4,95 $\pm$ 0,12 ^b	1,2 $\pm$ 0,01 ^a	0,80 $\pm$ 0,01 ^b	79,78 $\pm$ 0,60 ^a	74,12 $\pm$ 0,29 ^b
Σ das médias	18,64	16,66	8,59	7,67	291,94	310,92
Média final	4,66	4,17	2,15	1,92	72,99	77,73

^{a,b} Médias de uma mesma linha seguidas por letras diferentes, diferem entre si ao nível de significância de, no mínimo, 5%, com diferenças significativas entre o grupo controle e o grupo infectado.

A análise da regressão polinomial mostrou um padrão reprodutivo alternante nos moluscos controle, onde períodos de alta produção de ovos foram seguidos por períodos de baixa produção de ovos, com uma forte relação positiva entre os parâmetros analisados. Essas análises indicam uma inversão no padrão reprodutivo de *S. octona*, resultando em uma relação negativa entre os parâmetros analisados, onde os moluscos começam com uma baixa produção de ovos, até o 20º d.p.i., seguida de um investimento reprodutivo (Figura 1B).

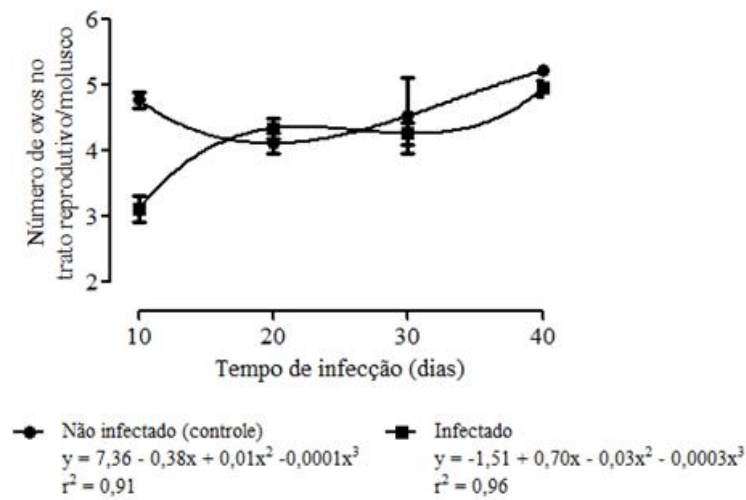
Uma redução em 2,59% do conteúdo de galactogênio na glândula de albúmen dos animais infectados decorridos 10 d.p.i. (63,65 $\pm$ 1,52) foi observada em comparação com o grupo controle (65,34 $\pm$ 3,84). Após 20 d.p.i. e 30 d.p.i, aumentos significativos em 17,77% e 18,07% foram observados nos moluscos infectados (79,60 $\pm$ 0,31 e 93,55 $\pm$ 0,62, respectivamente) em relação aos grupos controle (67,59 $\pm$ 2,54 e 79,23 $\pm$ 1,86, respectivamente). No entanto, aos 40 d.p.i. o conteúdo de galactogênio nos moluscos infectados (74,12 $\pm$ 0,29) mostraram uma diminuição significativa em 7,09% comparado ao controle (79,78 $\pm$ 0,60) (Tabela 1).

A análise de regressão mostrou uma forte relação positiva em ambos os grupos. Aos 20 d.p.i., o conteúdo de galactogênio estava elevado nos moluscos infectados, porém aos 30 d.p.i.

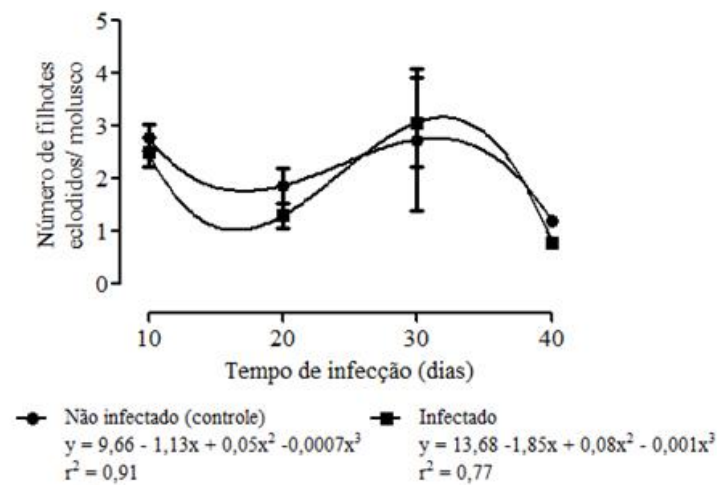
foi observado um declínio. No entanto, os dois grupos (controle e infectado) apresentaram, o mesmo padrão de variação no conteúdo de galactogênio (Figura 1C).

À análise histológica, observamos que nos moluscos não infectados a atividade reprodutiva foi preservada, com gametogênese ativa e a presença de gametas masculinos e femininos em diferentes estágios de desenvolvimento (Figura 2A). No entanto, como resultado da infecção em *P. bragai* uma redução foi observada no número de oócitos presentes no ovotestis aos 30 d.p.i. (Figura 2B). Os oócitos observados nos moluscos infectados apresentavam citoplasma irregular e granuloso e núcleos em processo de apoptose.

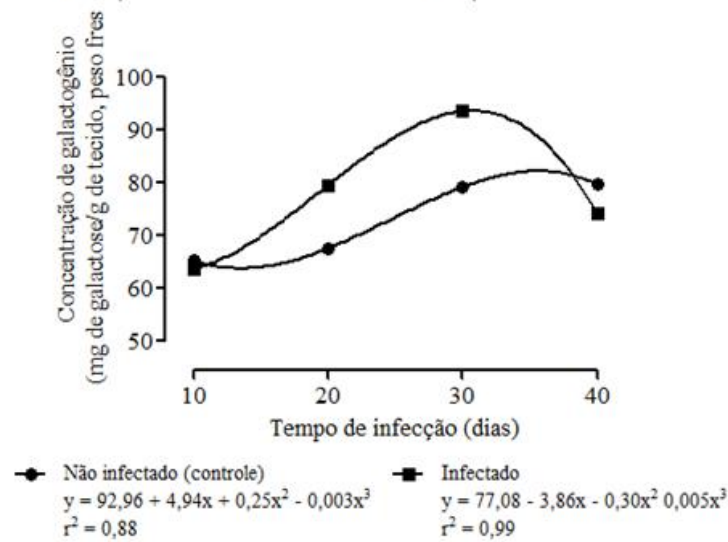
Figura 1: Relação entre parâmetros reprodutivos em *Subulina octona* e o tempo de infecção com *Paratanaisia bragai*, durante 40 dias pós infecção (d.p.i.). A) Número de ovos observados no trato reprodutivo, B) Número de moluscos eclodidos por moluscos e C) Conteúdo de galactogênio.



A

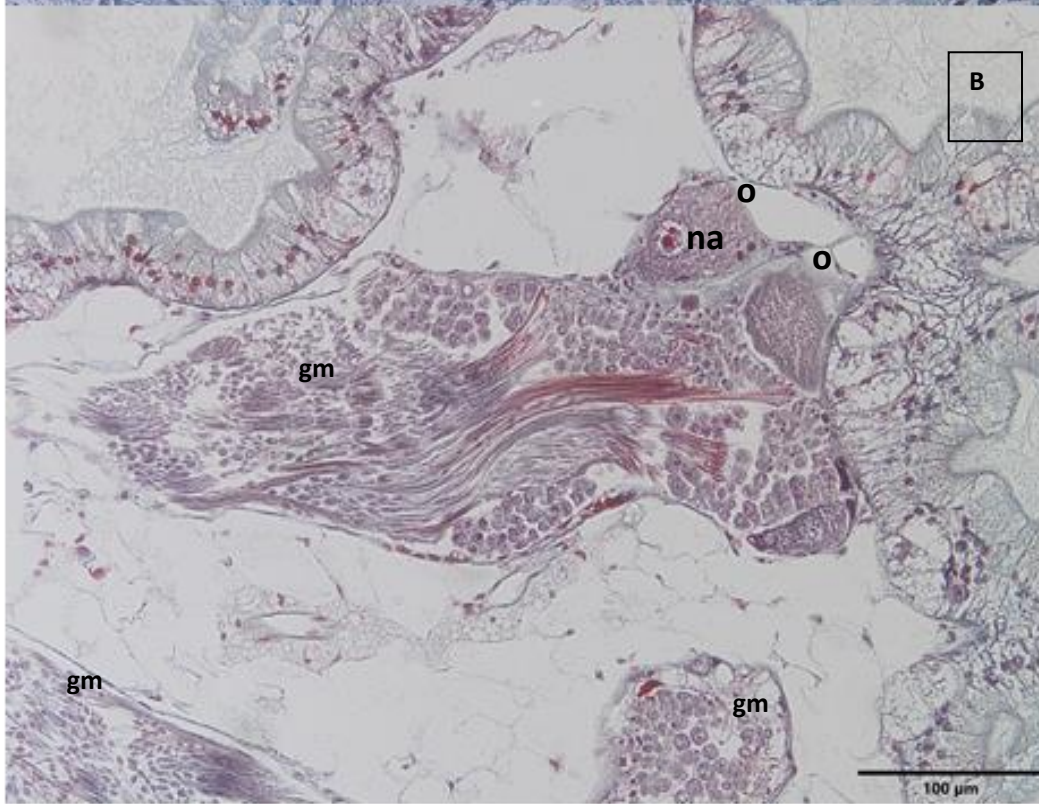
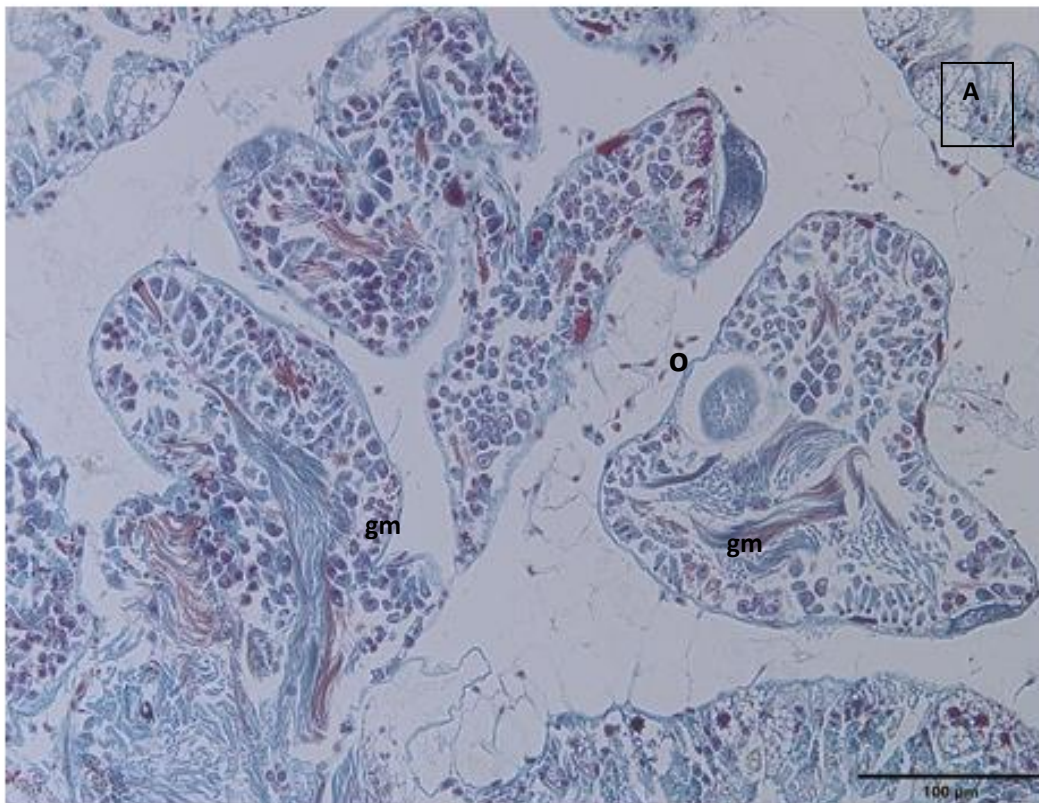


B



C

Figura 2: Corte histológico do tecido gonadal do molusco *Subulina octona*. A) Corte de um molusco não infectado, mostrando numerosos gametas masculinos (gm) em diferentes estágios de maturação em um oócito (o). Barra da escala = 100 μ m. B) Corte de um molusco experimentalmente infectado pelo trematódeo *Paratanaisia bragai* aos 40 dias pós infecção (d.p.i.) mostrando numerosos gametas masculinos (gm) em diferentes estágios de maturação e dois oócitos (o) com citoplasma granular e núcleo (na) em processo apoptótico. Barra da escala = 100 μ m. Coloração: tricrômico de Gomori.



4 DISCUSSÃO

O primeiro a observar que *S. octona* é capaz de atuar experimentalmente como hospedeiro de *P. bragai* foi Maldonado (1945). Porém, Keller e Araújo (1992) afirmaram que esse trematódeo digenético não obteve sucesso na infecção experimental em *S. octona*. Após cinco anos, Brandolini e colaboradores (1997) mostraram que *S. octona* atua como hospedeiro intermediário de *P. bragai* em condições experimentais e avaliaram o efeito do parasitismo sobre aspectos reprodutivos e biológicos. No entanto, no presente estudo, os resultados encontrados previamente foram complementados. Alterações reprodutivas foram associadas às alterações metabólicas no hospedeiro durante o período pré-patente do desenvolvimento do parasito.

O número total de ovos observados no trato reprodutivo dos moluscos foi reduzido como resultado da infecção embora haja disponibilidade de galactogênio. Isso é evidente, a partir da análise de regressão polinomial, que revelou a inversão do padrão oscilatório na produção de ovos, deixando de ser uma relação positiva, evidenciando que os moluscos infectados iniciaram sua atividade reprodutiva com menor investimento, seguido de um aumento na produção de ovos em relação aos moluscos não infectados. Sullivan e colaboradores (1985) observaram um fenômeno similar em outros sistemas parasito-hospedeiro, chamado de compensação de fecundidade. No presente estudo, apenas observamos essa compensação aos 20 d.p.i. quando, então, o número de ovos produzidos foi ligeiramente maior (5,6%) no grupo de moluscos infectados.

Notavelmente, este aumento aos 20 d.p.i. nos moluscos infectados não se traduziu em aumento no sucesso reprodutivo, uma vez que o número de ovos eclodidos foi menor que o dos moluscos controle, embora tenha havido um maior investimento energético no processo reprodutivo, com um aumento de aproximadamente 18% no conteúdo de galactogênio nos moluscos infectados.

Apesar do menor investimento inicial, evidenciado pela reversão do padrão oscilatório na produção de ovos, os moluscos infectados não conseguiram manter um padrão semelhante ao observado nos moluscos controle em sua biologia reprodutiva. A eclodibilidade manteve o

mesmo padrão em ambos os grupos, porém os moluscos infectados, em média, tiveram uma taxa de eclosão menor do que os espécimes não infectados.

O aumento do conteúdo de galactogênio durante os períodos de 20 d.p.i. até 30 d.p.i. indica que os moluscos, em certa medida, mantiveram a via biossintética deste polissacarídeo a uma taxa normal. Apesar da produção de ovos e alta quantidade de galactogênio, muitos embriões não eram viáveis, como evidenciado pela redução na taxa de eclosão dos moluscos infectados. Além disso, observou-se que, em média, o conteúdo de galactogênio foi maior na glândula de albúmen dos moluscos infectados do que naqueles não infectados, evidenciando que o processo de castração parasitária observado no sistema *S.octona/P.bragai* não pode ser classificado como castração nutricional (BAUDOIN, 1975). Em conclusão, mesmo com o aumento do investimento em energia, houve falha dos processos compensatórios, resultando em um processo de castração em moluscos parasitados. Em 1971, Fantin e Gervaso demonstraram a presença das enzimas UTP-glicose-1-fosfato uridililtransferase (E.C. 2.7.7.9) e UDP-glicose 4-epimerase (E. C. 5.1.3.2) em glândula de albúmen de *Helix pomatia* e *Lymanea stagnalis*. van Elk e Joosse (1981) evidenciaram que a atividade catalítica da enzima UDP-galactose 4-epimerase em glândula de albúmen de *L. stagnalis* infectada com miracídeos de *Trichobilharzia ocellata*, foi significativamente reduzida em relação a atividade desta mesma enzima em moluscos não infectados. Assim sendo, tais autores evidenciaram a possibilidade do parasito modular a atividade de enzimas importante na via metabólica de galactogênese e afetar a mobilização do galactogênio presente na glândula de albumen para a formação dos ovos e desenvolvimento dos embriões.

A interferência das larvas do trematódeo digenético na reprodução do molusco hospedeiro é um fenômeno comum (PINHEIRO; AMATO, 1995). O termo castração parasitária é usado quando há uma interrupção ou uma diminuição na atividade reprodutiva dos moluscos em resposta a infecções parasitárias. Isso pode ser causado por mecanismos diretos, como a destruição dos tecidos gonadais do hospedeiro durante o desenvolvimento larval intramolusco do parasito, ou indiretamente, devido a mudanças na ação hormonal ou absorção de nutrientes circulantes na hemolinfa, necessária para o desenvolvimento e manutenção do parasito e do molusco (BAUDOIN, 1975; TUNHOLI-ALVES et al., 2011).

Os resultados obtidos no presente estudo mostraram que a presença do parasito causou uma diminuição na atividade reprodutiva dos moluscos infectados, principalmente decorridos 10 e 40 dias de infecção, quando o número de ovos no trato reprodutivo/molusco, número de moluscos eclodidos/molusco e conteúdo de galactogênio apresentaram redução na comparação com o grupo controle. Brandolini e Amato (2006), monitorando o desenvolvimento intramolusco de *P. bragai* em *S. octona*, observaram que aos seis, oito e dez dias após a infecção, foi possível observar esporocistos de primeira geração próximos à parede do intestino e se espalhando em direção a glândula digestiva. A capacidade germinativa do esporocisto de primeira geração depende da disponibilidade de espaço nos tecidos do hospedeiro (MALDONADO, 1945). Brandolini e Amato (2006), também observaram a presença de esporocistos de segunda geração após 15 dias de infecção e após 32 dias a presença de cercárias e metacercárias completamente desenvolvidas na glândula digestiva.

O fato de que, através da análise histopatológica, não terem sido observadas larvas de *P. bragai* em desenvolvimento na região da gônada do molusco infectado, evidencia que o processo de castração observado no sistema *P. bragai/S. octona*, não é nutricional, divergindo do que foi observado em estudo anterior realizado por Brandolini e colaboradores (1997). Brandolini e Amato (2006) relataram que a castração neste sistema parasito-hospedeiro é mecânica, devido a presença de metacercárias no ovotestis de moluscos. Não identificamos a presença de larvas no ovotestis e os tecidos gonadais não apresentaram alterações morfológicas ou estruturais devido à pressão mecânica. Adicionalmente, foi observada ausência de desenvolvimento de oócitos ou desenvolvimento de número reduzido de ovócitos nos hospedeiros infectados.

Assim, a quantidade semelhante de galactogênio e a ausência de larvas em desenvolvimento nos tecidos gonadais indicam a existência de um processo endócrino, levando à inibição da maturação dos oócitos, provavelmente devido à presença de produtos de excreção e secreção (E/S) liberados pelas larvas durante o seu desenvolvimento intramolusco. Nesse caso, a castração parasitária parece afetar apenas o aparelho reprodutor feminino do hospedeiro. De Jong-Brink (1995) aponta que os hormônios gonadotróficos femininos, calfluxina (CaFl) e hormônio das células caudodorsais (CDCH), produzidos pelas células secretoras caudodorsais (CDC), controlam a oviposição e comportamentos associados. Já o

hormônio do corpo dorsal (DBH), produzido pelas células do corpo dorsal (DB), regula a diferenciação e o crescimento do sistema reprodutor feminino e a maturação dos oócitos. Portanto, a redução média na produção de ovos, redução no número de oócitos no ovostetis, parecem indicar que a castração, não nutricional e nem direta, ocorre de forma indireta pela modulação do SNE do hospedeiro pelo parasito, afetando o funcionamento das regiões secretoras do CDC e DB.

Morley (2010) indicou que muitas espécies de nematoides terrestres têm a capacidade de usar moluscos aquáticos em condições naturais para completar seu ciclo biológico, com a compatibilidade fisiológica entre hospedeiros e parasitos sendo observada. No entanto, os trematódeos são muito específicos na escolha do hospedeiro intermediário para o seu desenvolvimento larval. Assim, é importante realizar estudos para esclarecer a relação parasito-hospedeiro entre os trematódeos e seus hospedeiros terrestres.

Em geral, a literatura sobre o trematódeo digenético *P. bragai* está relacionada à ocorrência desse parasito em diferentes espécies de aves que podem atuar como hospedeiros definitivos. Poucos estudos têm procurado elucidar a relação do parasito com seus hospedeiros intermediários *S. octona* e *L. unilamellata*. Aliado ao fato de que os autores que estudaram o processo de castração parasitária obtiveram resultados diferentes, com esse sistema parasito-hospedeiro, demonstrando a necessidade de continuação desse estudo com inclusão de novas metodologias que contribuam para a elucidação do tipo de castração parasitária e seus mecanismos determinantes.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDO, W.; SULTAN, K. Histopathological findings of the kidney Trematoda *Paratanaisia* spp. (Digenea: Eucotylidae) in cattle egret (*Bubulcus ibis*). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 2, p. 312-313, 2013. <https://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612013000200050>.

ALFARO-ALARCÓN, A.; MORALES, J. A.; VENEZIANO, V.; SANTORO, M. Fatal *Paratanaisia bragai* (Digenea: Eucotylidae) infection in scarlet macaws (*Ara macao*) in Costa Rica. **Acta parasitologica**, v. 60, n. 3, p. 548-552, 2015. <https://doi.org/10.1515/ap-2015-0078>.

ARAÚJO, J. L. B.; BESSA, E. C. A. Moluscos de importância econômica no Brasil. II. Subulinidae, *Subulina octona* (Bruguière) (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata, Stylommatophora). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 10, p. 489 – 497, 1993. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-81751993000300016>.

BAUDOIN, M. Host castration as a parasitic strategy. **Evolution**, v. 29, p. 335–352, 1975.

BOFFI, A. V. **Moluscos brasileiros de interesse médico e econômico**. São Paulo: Hucitec, 1979.

BORAH, M. K.; RAHMAN, T.; GOSWAMI, S.; ISLAM, S. On the incidence and pathology of *Paratanaisia bragai* dos Santos, 1934 (Freitas, 1959) infection in domestic pigeon (*Columba livia*). **Journal of Veterinary Parasitology**, v. 23, n. 2, p. 159 – 161, 2009.

BRANDOLINI, S. V. P. B. **Biologia de *Tanaisia (Paratanaisia) bragai* (Santos, 1934) (Digenea, Eucotylidae)**. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Instituto de Medicina Veterinária, Departamento de Parasitologia Veterinária. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, 2000.

BRANDOLINI, S. V. P. B.; AMATO, S. B. Desenvolvimento larval de *Paratanaisia bragai* (Santos) (Digenea, Eucotylidae) sob condições experimentais. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 23, n. 4, p. 1097-1100, 2006. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-81752006000400017>.

BRANDOLINI, S. V. P. B.; AMATO, S. B.; PEREIRA, A. A. Relacionamento de *Tanaisia bragai* (Digenea, Eucotylidae) e seu hospedeiro intermediário, *Subulina octona* (Gastropoda, Subulinidae) sob condições experimentais. **Parasitología al día**, v. 21, p. 109-113, 1997. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-07201997000300008>.

BRANDOLINI, S. V. P. B.; GOMES, A. P. S. Influência de diferentes dietas sobre o crescimento, sobrevivência e reprodução de *Leptinaria unilamelata* (d'Orbigny, 1835) (Gastropoda, Subulinidae) em laboratório. **Revista Brasileira de Zoociências**, vol. 4, n. 2, p. 169-177, 2002.

CALDEIRA, R. L.; MENDONÇA, C. L. G.; GOVEIA, C. O.; LENZI, H. L.; GRAEFF-TEIXEIRA, C.; LIMA, W. S.; MOTA, E. M.; PECORA, I. L.; MEDEIROS, A. M. Z.; CARVALHO, O. S. First record of molluscs naturally infected with *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) (Nematoda: Metastrongylidae) in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 7, p. 887-889, 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762007000700018>

CREWS, A. E.; YOSHINO, T. P. Influence of larval schistosomes on polysaccharide synthesis in albumin glands of *Biomphalaria glabrata*. **Parasitology**, v. 101, p. 351-359, 1990.

DE JONG-BRINK, M. How schistosomes profit from the stress responses they elicit in their hosts. **Advances in parasitology**, v. 35, p. 177-256, 1995.

DURÇO, E.; MATOS, F.; PILATE, V.; CORTEZ, L.; BESSA, E. A.; SILVA, L. Estudo comportamental comparado entre *Subulina octona* (Brugüière, 1789) e *Leptinaria unilamellata* (d'Orbigny, 1835) (Mollusca: Subulinidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 15, n. 1,2,3, p. 97-105, 2013.

FANTIN, A. M.; GERVASO, M. V. A histoenzymatic investigation of galactogen synthesis in the albumen gland of *Helix pomatia* and *Lymnaea stagnalis*. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 28, n. 1, p. 88-94, 1971.

FARO, M. J.; PERAZZINI, M.; CORRÊA, L. S.; MELLO-SILVA, C. C.; PINHEIRO, J.; MOTA, E. M.; SOUZA, S.; ANDRADE, Z.; MALDONADO JR., A. Biological, biochemical and histopathological features related to parasitic castration of *Biomphalaria glabrata* infected by *Schistosoma mansoni*. **Experimental Parasitology**, v. 134, p. 228 – 234, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2013.03.020>.

FERNANDES, M. C. **Métodos escolhidos de técnicas microscópicas**. 2ed. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1949.

FERREIRA, A. M. R.; ALMEIDA, E. C. P. Platinosomose. In: SOUZA, H. J. M. **Coletâneas em Medicina e Cirurgia Felina**. LF Livros de Veterinária Ltda., Rio de Janeiro, 2003, p.385 - 393.

GOMES, D. C.; MENEZES, R. C.; TORTELLY, R.; PINTO, R. M. Pathology and first occurrence of the kidney trematode *Paratanaisia bragai* (Santos, 1934) Freitas, 1959 (Digenea:

Eucotylidae) in *Phasianus colchicus* L., 1758, from Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 3, p. 285-288, 2005.

GOMOT, P.; GOMOT, L.; GRIFFOND, B. Evidence for a light compensation of the inhibition of reproduction by low temperatures in the snail *Helix aspersa*. Ovotestis and albumen gland responsiveness to different conditions of photoperiods and temperatures. **Biology of Reproduction**, v. 40, n. 6, p. 1237-1245, 1989.

KANEV, I.; RADEV, V.; FRIED, B. Family Eucotylidae Cohn, 1904. In: GIBSON, D. J.; BRAY, R. A.; JONES, A. (Eds). **Keys to the trematoda**. Wallingford: CAB International, v. 1, 2002. p. 147-152.

KELLER, G. G.; ARAÚJO, J. L. B. Ciclo evolutivo de *Paratanaisia bragai* (Santos, 1934) (Trematoda, Eucotylidae) como novo hospedeiro intermediário no Brasil: *Leptinaria unilamellata* (D'Orbigny, 1835) (Gastropoda, Pulmonata, Subulinidae) em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 1, n. 2, p. 89 – 92, 1992.

KUMAR, B. M.; TAIBUR, R.; SUSHANTA, G.; SAIDUL, I. On the incidence and pathology of *Paratanaisia bragai* dos Santos, 1934 (Freitas, 1959) infection in domestic pigeon (*Columba livia*). **Journal of Veterinary Parasitology**, v. 23, n. 2, p. 159-161, 2009.

LUPPI, M. M.; DE MELO, A. L.; MOTTA, R. O.; MALTA, M. C.; GARDINER, C. H.; SANTOS, R. L. Granulomatous nephritis in psittacines associated with parasitism by the trematode *Paratanaisia* spp. **Veterinary Parasitology**, v. 146, n. 3-4, p. 363-366, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.03.011>.

MALDONADO, J. F. The life cycle of *Tamerlania bragai*, Santos, 1934 (Eucotylidae), a kidney fluke of domestic pigeons. **Journal of Parasitology**, v. 31, n. 5, p. 306 – 314, 1945. <http://dx.doi.org/10.2307/3273085>.

MALIK, M.; GOSWAMI, S.; UPADHYAYA, T. N.; PHANGCHO, C. V.; BEGUM, S.; ISLAM, S.; KALITA, D. J. Pathological and histochemical alterations of *Paratanaisia bragai* infection in domestic pigeon (*Columba livia*). **Indian Journal of Veterinary Pathology**, v. 40, n. 2, p. 157-161, 2016.

MINCHELLA, D. J. Host-history variation in response to parasitism. **Parasitology**, v. 90, p. 205-216, 1985. <https://doi.org/10.1017/S0031182000049143>.

MORLEY, N. J. Aquatic mollusks as auxiliary host for terrestrial nematode parasites: implications for pathogens transmission in a changing climate. **Parasitology**, v.137, p. 1041-1056, 2010. <https://doi.org/10.1017/S0031182010000016>.

MOUDGIL, A. D.; SINGLA, L. D.; GUPTA, K. Morpho-pathological description of first record of fatal concurrent intestinal and renal parasitism in *Columba livia domestica* in

India. **Indian Journal of Animal Research**, v. 52, p. 1063-1067, 2017. DOI:10.18805/ijar.v0iOF.9140

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, n. 5, p. 635-638, 1995. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761995000500019>.

PINHEIRO, J.; GOMES, E. M. A method for glycogen determination in molluscs. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 37, n. 3, p. 569 – 576, 1994.

SANDLAND, G. J.; MINCHELLA, D. J. Costs of immune defense: An enigma wrapped in an environmental cloak? **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 12, p. 571 – 574, 2003. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2003.10.006>.

SANTI, M.; ANDRE, M. R.; HOPPE, E. G. L.; WERTHER, K. Occurrence of *Paratanaisia confusa* Freitas, 1951 in free-living guira cuckoo (*Guira guira*, Cuculiformes: Crotophagidae). **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 26, n. 2, p. 248-251, 2017.

SANTI, M.; COUTO, C.; WERTHER, K. Occurrence of *Paratanaisia* spp. Freitas, 1951 in a domiciled cockatiel (*Nymphicus hollandicus*, Psittaciformes: Cacatuidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 27, n. 4, p. 575- 578, 2018. <https://doi.org/10.1590/S1984-296120180034>.

SILVA, T. M.; PAVAN, L. F.; GUIMARÃES-OKAMOTO, P. T. C.; MILBRADT, E. L.; ANDREATTI FILHO, R. L.; SILVA, R. J.; OKAMOTO, A.S. First record of *Paratanaisia bragai* (Digenea: Eucotylidae) in blue and gold macaw (*Ara ararauna*). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, n. 1, p. 112-115, 2016. <https://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612016001>.

SULLIVAN, J. T.; CHENG, T. C.; HOWLAND, K. H. Studies on parasitic castration: castration of *Ilyanassa obsoleta* (Mollusca: Gastropoda) by several marine trematodes. **Transactions of the American Microscopical Society**, v. 104, n. 2, p. 154-171, 1985. <https://dx.doi.org/10.2307/3226423>

SUMNER, J. B. A method for colorimetric determination for phosphorus. **Science**, v. 2601, n. 100, p. 413 – 414, 1924.

TARODA, A.; BARROS, L. D.; ZULPO, D. L.; CUNHA, I. A. L.; PAIVA, M. C. D. C.; SAMMI, A. S.; SANTOS, J. R.; YAMAMURA, M. H.; VIDOTTO, O.; GARCIA, J. L. Occurrence of gastrointestinal and renal helminths in *Zenaida auriculata* (Des Murs, 1847) trap-captured from Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 3, p. 415-419, 2013. <https://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612013000300016>.

TAVELA, A. O.; CARRETTA JUNIOR, M.; OLIVEIRA, A. R.; CARNEIRO, F. T.; SILVA, V. H. D.; BRAGA, F. R.; PEIXOTO, J. V.; CARVALHO, G. D.; ARAÚJO, J. V.; PAULA, T. A. R. Parasitism by *Paratanaisia bragai* (Digenea, Eucotylidae) in common waxbill (*Estrilda astrild*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 4, p. 1276-1280, 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-7136>.

TEODORO, T. G. W.; OLIVEIRA JUNIOR, I. M.; LIMA, H. C.; REIS, M. O.; MIRANDA, J. L.; FAVORETTO, S. M.; PINTO, H. A.; LACRETA JÚNIOR, A. C. C.; WOUTERS, A. T. B.; VARASCHIN, M. S. *Psittacara leucophthalmus* (Aves: Psittacidae) como um novo hospedeiro de *Paratanaisia bragai* (Trematoda: Eucotylidae) no Brasil: achados clínicos e patológicos: relato de caso. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, n. 5, p. 1569 – 1576, 2018. <https://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-10300>.

TOLOSA, E. M. C.; RODRIGUES, C. J.; BEHMER, O. A.; FREITAS-NETO, A. G. **Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica**, 2 ed. São Paulo: Manole, 2003.

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, p. 192–195, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2010.09.006>.

TUNHOLI-ALVES, V. M.; TUNHOLI, V. M.; LUSTRINO, D.; SANTOS-AMARAL, L.; THIENGO, S. C.; PINHEIRO, J. Changes in the reproductive biology of *Biomphalaria glabrata* experimentally infected with the nematode *Angiostrongylus cantonensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 108, p. 220-223, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2011.08.009>

UNWIN, S.; CHANTREY, J.; CHATTERTON, J.; ALDHOUN, J. A.; LITTLEWOOD, D. T. J. Renal trematode infection due to *Paratanaisia bragai* in zoo housed Columbiformes and a red bird-of-paradise (*Paradisaea rubra*). **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 2, p. 32-41, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2012.11.001>.

VAN ELK, R.; AND JOOSSE, J. The UDP-galactose 4-epimerase of the albumen gland of *Lymnnea stagnalis* and the effects of photoperiod, starvation and trematode infection on its activity. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 70B, p. 45-52, 1981.

WANG, Q. P.; LAI, D. H.; ZHU, X. Q.; CHEN, X. G.; LUN, Z. R. Human angiostrongyliasis. **Lancet Infectious Diseases**, v. 8, p. 621– 630, 2008. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(08\)70229-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(08)70229-9).

XAVIER, V. B.; OLIVEIRA-MENEZES, A.; SANTOS, M. A. J.; AMATO, S. B.; TORRES, E. J. L.; PINHEIRO, J. S.; BRANDOLINI, S. V. P. B. Histopathological changes in the kidneys of vertebrate hosts infected naturally and experimentally with *Paratanaisia bragai*

(Trematoda, Digenea). **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 24, n. 2, p. 241 – 246, 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612015017>.

CAPÍTULO II

**AVALIAÇÃO DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS DO MOLUSCO
TERRESTRE *SUBULINA OCTONA* (BRUGÜIÈRE, 1789) (GASTROPODA,
SUBULINIDAE) EXPERIMENTALMENTE INFECTADO PELO TREMATÓDEO
PARATANAISIA BRAGAI (SANTOS, 1934) (DIGENEA, EUCOTYLIDAE)**

RESUMO

Entre os efeitos do desenvolvimento larval de trematódeos digenéticos em seus hospedeiros intermediários, destacam-se as alterações no metabolismo de carboidratos dos moluscos. O objetivo do estudo foi analisar os efeitos da infecção por *Paratanaisia bragai* sobre o conteúdo de glicogênio presente na glândula digestiva e na massa cefalopediosa do molusco terrestre *Subulina octona* experimentalmente infectado, assim como verificar a concentração de glicose, a atividade da enzima D-lactato desidrogenase (EC1.1.1.27 and EC1.1.1.28) (LDH) e a concentração de alguns ácidos orgânicos (ácido oxálico, succínico, pirúvico e láctico) presentes na hemolinfa. Análises histoquímicas da massa cefalopediosa e da glândula digestiva também foram realizadas. Foi verificado o aumento total de 54,81% na concentração de glicose nos moluscos infectados, e um padrão oscilante no conteúdo de glicogênio presente na massa cefalopediosa (+30,50%, -6,4%, +44,01% e -18,90% em 10, 20, 30 e 40 d.p.i, respectivamente) e na glândula digestiva (+15,26%, -6,3%, +13,84%, +2,19%, em 10, 20, 30 e 40 d.p.i, respectivamente). A atividade de LDH apresentou aumento aos 10 d.p.i. (+74,32%) e 40 d.p.i. (+47,81%) e diminuição aos 20 d.p.i. (-3,03%) e 30 d.p.i. (-32,77%). Os ácidos oxálico, succínico e pirúvico apresentaram reduções significativas e progressivas, no entanto o ácido láctico apresentou aumento significativo. A análise dos cortes histológicos mostrou desorganização tecidual na massa cefalopediosa dos moluscos infectados e alterações morfológicas na glândula digestiva. Esses resultados confirmam que a infecção provocou mudanças na via metabólica utilizada pelo molusco pois ocorreu a ativação de uma via anaeróbica alternativa para a obtenção de energia indicada pelo aumento do conteúdo de ácido láctico e aumento da atividade de LDH.

Palavras-chave: metabolismo anaeróbio, relação parasito-hospedeiro, ácidos orgânicos.

ABSTRACT

Among the effects caused by the larval development of digenetic trematodes able to use snails as intermediate hosts, changes may be observed in the carbohydrate metabolism. The aim of this study was analyze the effects of *P. bragai* infection on the glycogen content present in the digestive gland complex and cephalopodal mass in the terrestrial snail *S. octona*, and also verify the glucose concentration and the enzyme D- e L-lactate dehydrogenase activity (EC1.1.1.27 and EC1.1.1.28) (LDH) and the concentration of some organic acids (oxalic, succinic, pyruvic and lactic acid) present in hemolymph. Histochemical analyzes were also performed. A total increase of 54.81% in glucose concentration in infected snails and an oscillating pattern in the glycogen content in the cephalopodal mass (+ 30.50%, -6.4%, + 44.01% and - 18.90% at 10, 20, 30 and 40 d.p.i., respectively) and in the digestive gland complex (+ 15.26%, -6.3%, + 13.84%, + 2.19%, at 10, 20 , 30 and 40 d.p.i., respectively) was verified. LDH activity shows an increase of 10 d.p.i. (+ 74.32%) and 40 d.p.i. (+ 47.81%) and at 20 d.p.i. (-3.03%) and 30 d.p.i. (-32.77%) a decrease. The oxalic, succinic and pyruvic acids showed a significant and progressive reduction; however, lactic acid had a significant increase. Histology showed a tissue disorganization in the cephalopodal mass of infected snails and morphological changes in the digestive gland. These results confirm that infection causes metabolic pathway changes in the snails due to activation of an alternative anaerobic pathway for produce energy.

Keywords: anaerobic metabolism, host parasite relationship, organic acids.

1 INTRODUÇÃO

Trematódeos digenéticos pertencentes ao gênero *Paratanaisia* (Santos, 1934) Freitas 1959 são parasitos do sistema urinário de aves (SANTI et al., 2018). *Paratanaisia bragai* (Santos, 1934) é encontrado em ductos renais de diversas aves domésticas e silvestres. Os ovos embrionados são eliminados nos produtos de excreção do hospedeiro definitivo, os moluscos ingerem esse conteúdo, dessa forma a infecção ocorre de maneira passiva. No molusco, há a liberação dos miracídios e o desenvolvimento de duas gerações de esporocistos, posteriormente há o desenvolvimento de cercárias e o encistamento em metacercárias. O hospedeiro definitivo adquire a infecção através da ingestão do molusco contendo as metacercárias (XAVIER, 2015).

O ciclo biológico de *P. bragai*, usando *Subulina octona* (Brugüière, 1789) como hospedeiro intermediário, foi estudado pela primeira vez por Maldonado (1945). Posteriormente, Keller e Araujo (1992) realizaram infecções experimentais de *S. octona* com este parasito, porém não obtiveram sucesso na infecção e concluíram que esta espécie de molusco não atuava como hospedeiro intermediário nesse ciclo. Porém, Brandolini e colaboradores (1997) e Brandolini e Amato (2006), em condições experimentais, demonstraram que *P. bragai* é capaz de completar o seu desenvolvimento larval em *S. octona*. Esses estudos analisaram a influência do parasitismo sobre a função reprodutiva dos moluscos infectados e registraram a localização e morfologia das larvas do parasito durante 40 dias após a infecção.

Entre os efeitos do desenvolvimento larval de trematódeos em moluscos que atuam como hospedeiros intermediários, alterações no metabolismo de carboidratos são observadas, principalmente no conteúdo de glicose (PINHEIRO; AMATO, 1994). Moluscos apresentam metabolismo predominantemente aeróbio para a obtenção de energia, porém quando expostos a situações fisiológicas adversas, como o parasitismo por larvas de trematódeos, podem redirecionar o fluxo do metabolismo energético, alterando esta característica (TUNHOLI et al., 2013).

Com base na importância associada ao metabolismo de carboidratos em moluscos infectados por helmintos e para melhor compreender a relação parasito-hospedeiro que ocorre

no modelo *P. bragai*/*S. octona*, o objetivo do presente estudo foi analisar os efeitos da infecção por *P. bragai* sob o conteúdo de glicogênio presente na glândula digestiva e na massa cefalopediosa dos moluscos infectados, a concentração de glicose e a atividade da enzima D- e L-lactato desidrogenase (EC1.1.1.27 e EC1.1.1.28) (LDH) presente na hemolinfa dos moluscos. Além disso, foram determinadas as concentrações de ácidos orgânicos (ácido oxálico, succínico, pirúvico e láctico) na hemolinfa dos moluscos. Análises histoquímicas da glândula digestiva e da massa cefalopediosa foram realizadas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A obtenção dos moluscos aptos para a infecção e dos ovos do parasito foi realizada como descrito previamente no item 3 Metodologia Geral, encontrada na página 31.

2.1 Coleta das amostras

Os moluscos foram acompanhados durante um total de 40 dias, a cada 10 dias foi realizada a dissecação de um grupo controle e um grupo infectado para a coleta de hemolinfa, glândula digestiva e massa cefalopediosa em banho de gelo. A hemolinfa foi coletada após o ápice da concha ser removido, o conteúdo extravasado era gotejado diretamente em um microtubo eppendorf com capacidade para 1,5 ml, identificado e armazenado a -20 °C até sua utilização. A glândula digestiva e a massa cefalopediosa foram removidas, pesadas em balança digital analítica (Bel®), identificadas e armazenadas em microtubo eppendorf 1,5 ml a -20°C para posterior análise do conteúdo de glicogênio.

2.2 Determinação da concentração de glicose e da atividade da LDH

Para determinar o conteúdo de glicose e a atividade de LDH nas amostras de hemolinfa coletadas foi utilizado um analisador automático A15 (Biosystems®). Os kits de reagentes para a determinação da concentração de glicose a atividade de LDH eram da mesma marca fabricante do equipamento (Biosystems®).

Na verificação da concentração de glicose, 3 µL de hemolinfa foi adicionada a 300 µL do reagente de cor (fosfato 100 mmol/L, fenol 5 mmol/L, glicose oxidase 10 U/mL, peroxidase 1 U/mL, 4-aminoantipirina 0.4 mmol/L, pH 7,5), e o produto resultante da oxidação de 4-aminoantipirina foi medido ao espectrofotômetro em um comprimento de onda de 510nm à 37 °C (TRINDER, 1969)

Para determinar a atividade de LDH, foram adicionados 6 µL de hemolinfa a 300 µL de reagente (Tris 100 mmol/L, piruvato 2,75 mmol/L, cloreto de sódio 222 mmol/L, pH 7,2, NADH 1,55 mmol/L e Azida sódica 9,5 g/L). A absorbância foi medida em 340nm de

comprimento de onda à 37 °C (SOCIEDAD ESPANOLA DE QUÍMICA CLÍNICA, 1989; SCIENTIFIC COMMITTEE, 1982).

2.3 Determinação do conteúdo de glicogênio

O conteúdo de glicogênio presente na glândula digestiva e na massa cefalopediosa foi extraído segundo Pinheiro e Gomes (1994) e quantificado de acordo com o método 3,5 DNS (SUMNER, 1924) e os resultados foram expressos em mg glicose/g tecido, peso fresco.

2.4 Determinação dos ácidos orgânicos

Antes de analisar a hemolinfa através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), foram realizados dois procedimentos: a desproteinização (0,1 mL de hemolinfa foi adicionado 1,5 mL de água destilada, 0,2 mL de hidróxido de bário [Ba(OH)₂] 0,5N. Posteriormente, acrescenta-se 0,2 mL de sulfato de zinco (ZnSO₄) 5% e centrifuga-se à 3.556 G por 15 minutos, por fim o sobrenadante foi aliquoteado) (VILLELA et al., 1973). Em seguida, procedeu-se a concentração da amostra no Speed Vac até atingir o volume de 100 µl.

As etapas para a determinação dos ácidos orgânicos através da CLAE foram realizadas de acordo com o protocolo descrito em Tunholi-Alves e colaboradores (2014). Essas análises foram realizadas na Central Analítica Multiusuário, Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ (Cromatogramas e dados dos padrões utilizados, em anexo).

2.5 Análises histoquímicas

Aos 10, 20, 30 e 40 dias pós infecção, três moluscos de cada grupo (infectado e controle) foram dissecados e fixados em líquido de Duboscq-Brasil modificado (etanol 80°GL – 600 ml + formalina comercial – 250 ml + ácido acético glacial – 150 ml) (FERNANDES, 1949), durante 48h, transferidos para álcool 70% e mantidos em temperatura ambiente até o processamento histológico. Os tecidos foram processados através da técnica histológica de rotina no Laboratório de Técnicas Histológicas do Departamento de Biologia Animal, UFRRJ, cortes seriados com 5 µm de espessura foram obtidos e corados pela técnica do Ácido Periódico-Schiff (PAS) para detecção de glicogênio (HUMASON, 1979) e os cortes foram

observados em um microscópio Olympus BX51®; a aquisição das imagens foi feita através do Olympus CellSens Standard software (CS-ST-V1, CellSens Standard, v.1.00) ®.

2.6 Análises estatísticas

Os valores da concentração de glicose e atividade de LDH foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média devido ao fato de sua distribuição não seguir padrão normal. No entanto, os conteúdos de glicogênio e a concentração dos ácidos orgânicos foram expressos como média $\pm$ desvio padrão, uma vez a distribuição destes foi normal (InStat, GraphPad v.4.00; Prism, GraphPad v.3.02, Prism Inc). A ANOVA foi realizada seguida pelo teste de Tukey para comparar as médias (InStat, GraphPad v.4.00; Prism, GraphPad v.3.02, Prism Inc).

A regressão polinomial de terceira ordem foi calculada para analisar a relação entre os valores obtidos e o tempo de infecção (Prism, GraphPad v.3.02, Prism Inc).

3 RESULTADOS

A glicemia dos moluscos infectados, se manteve aumentada significativamente (21,11%, 24,77%, 11,47% e 156,93% decorridos 10 d.p.i, 20 d.p.i, 30 d.p.i e 40 d.p.i, respectivamente), em comparação com os moluscos controle, ao longo do período pré patente (Tabela 1; Figura 1A).

A atividade da enzima LDH foi aumentada (+74,32%) nos moluscos infectados após 10 d.p.i., quando comparada com os moluscos controle do mesmo período. Nos períodos seguintes, o padrão foi invertido, sendo a atividade desta enzima nos animais infectados (20 d.p.i. e 30 d.p.i. reduzidos em -3,03% e -32,77%, respectivamente) mantida abaixo do que foi observado nos moluscos não infectados. Após 40 d.p.i., a atividade de LDH foi novamente aumentada em 47,81% nos moluscos infectados (Tabela 1; Figura 1B). A média dos valores obtidos ao avaliar a atividade de LHD no grupo controle foi de 43,54, enquanto que no grupo infectado foi de 50,58, representando um aumento total de 16,17% para os moluscos infectados.

Tabela 1: Atividade da enzima lactato desidrogenase (UI) e concentração de glicose (mg/dL) na hemolinfa de *Subulina octona* experimentalmente infectada por *Paratanaisia bragai*, expressas como média $\pm$ erro padrão.

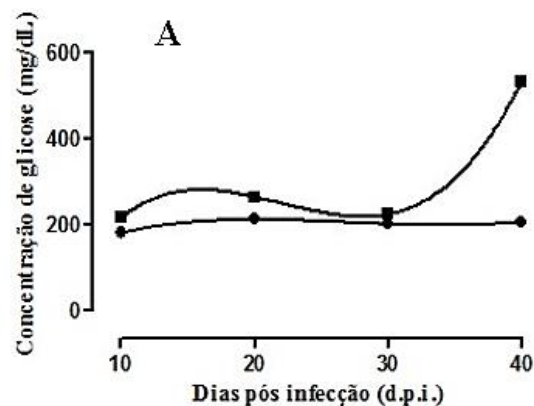
Dias pós infecção (d.p.i.)	Atividade de LDH (UI)		Concentração de glicose (mg/dL)	
	Controle	Infectado	Controle	Infectado
10	36,33 $\pm$ 7,31 ^a	63,33 $\pm$ 11,17 ^a	180,00 $\pm$ 3,79 ^a	218,00 $\pm$ 3,22 ^b
20	33,00 $\pm$ 13,08 ^a	32,00 $\pm$ 5,03 ^a	211,33 $\pm$ 2,40 ^a	263,67 $\pm$ 3,28 ^b
30	59,50 $\pm$ 12,50 ^a	40,00 $\pm$ 11,00 ^a	200,50 $\pm$ 2,50 ^a	223,50 $\pm$ 1,50 ^b
40	45,33 $\pm$ 8,99 ^a	67,00 $\pm$ 20,00 ^a	206,67 $\pm$ 2,91 ^a	531,00 $\pm$ 8,00 ^b

^{a, b}= médias de uma mesma linha seguidas por letras diferentes diferem significativamente em relação ao grupo controle em cada período do experimento.

O conteúdo de glicogênio presente na massa cefalopédica dos moluscos infectados apresentou um padrão oscilatório, em comparação com os moluscos controle, havendo um aumento significativo de +30,50% decorridos 10 d.p.i., seguido de uma redução significativa

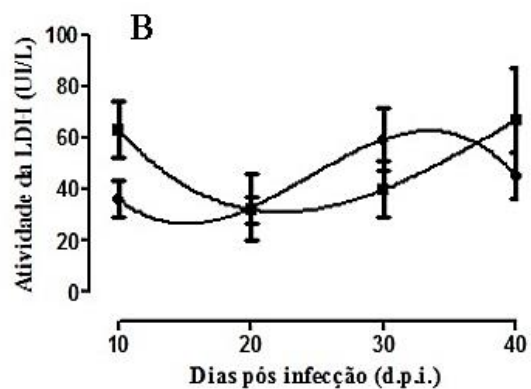
de -6,4% aos 20 d.p.i., e um novo aumento significativo em 44,01% aos 30 d.p.i seguido por uma diminuição significativa de 18,90% aos 40 d.p.i. (Tabela 2; Figura 1D).

Figura 1: Relação entre o conteúdo de carboidratos em *Subulina octona* infectada experimentalmente por *Paratanaisia bragai* e o tempo de infecção. A) Conteúdo de glicose presente na hemolinfa do molusco (mg/dL). B) Atividade da lactato desidrogenase (LDH) (UI). Conteúdo de glicogênio (mg de glicose/g de tecido, peso fresco). C) Glândula digestiva e D) Massa cefalopediosa. (Regressão polinomial de terceira ordem).



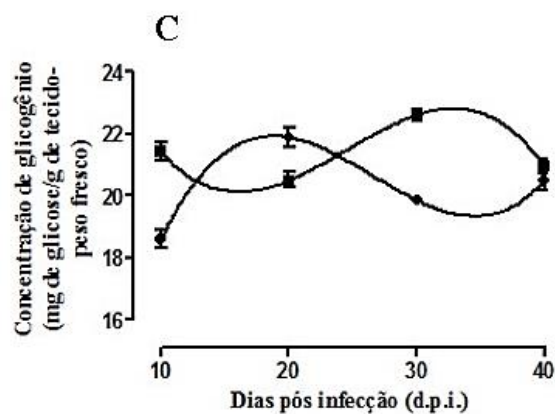
● Controle
 $y = 47,35 + 20,30x - 0,84x^2 + 0,0099x^3$
 $r^2 = 0,90$

■ Infetado
 $y = -347,0 + 96,92x - 4,76x^2 + 0,072x^3$
 $r^2 = 1,00$



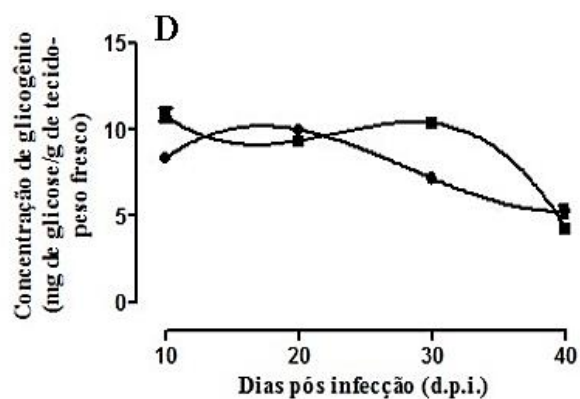
● Controle
 $y = 140 - 17,73x + 0,85x^2 - 0,012x^3$
 $r^2 = 0,32$

■ Infetado
 $y = 154,3 - 12,76x + 0,40x^2 - 0,0034x^3$
 $r^2 = 0,54$



● Controle
 $y = 2,02 + 2,59x - 0,11x^2 + 0,0013x^3$
 $r^2 = 0,97$

■ Infetado
 $y = 32,22 - 1,80x + 0,08x^2 - 0,0011x^3$
 $r^2 = 0,94$



● Controle
 $y = -3,13 + 1,8x - 0,08x^2 - 0,0009x^3$
 $r^2 = 0,99$

■ Infetado
 $y = 24,64 - 2,3x + 0,1x^2 - 0,0016x^3$
 $r^2 = 0,99$

Quando comparados o conteúdo de glicogênio na glândula digestiva dos moluscos infectados e controle, até 30 d.p.i., observamos padrão semelhante ao visualizado no conteúdo de glicogênio da massa cefalopediosa. Porém, nos moluscos infectados, aos 40 d.p.i., houve novamente o aumento na concentração deste polissacarídeo (+15,26%, 10 d.p.i.; -6,3%, 20 d.p.i.; +13,84%, 30 d.p.i.; +2,19%, 40 d.p.i.) (Tabela 2; Figura 1C).

Tabela 2: Conteúdo de glicogênio na massa cefalopediosa e na glândula digestiva (mg glicose/g tecido, peso fresco) em *Subulina octona* experimentalmente infectada por *Paratanaisia bragai* durante 40 dias pós infecção (d.p.i.), expresso como média $\pm$ desvio padrão.

Dias pós infecção (d.p.i.)	Conteúdo de glicogênio (mg glicose/g tecido, peso fresco)			
	Massa cefalopediosa		Complexo glândula digestiva	
	Controle	Infectado	Controle	Infectado
10	8,36 $\pm$ 0,12 ^a	10,91 $\pm$ 0,37 ^b	18,60 $\pm$ 0,30 ^a	21,44 $\pm$ 0,32 ^b
20	10,00 $\pm$ 0,08 ^a	9,36 $\pm$ 0,11 ^b	21,89 $\pm$ 0,30 ^a	20,51 $\pm$ 0,24 ^b
30	7,18 $\pm$ 0,19 ^a	10,37 $\pm$ 0,12 ^b	19,87 $\pm$ 0,14 ^a	22,62 $\pm$ 0,18 ^b
40	5,29 $\pm$ 0,33 ^a	4,29 $\pm$ 0,25 ^b	20,51 $\pm$ 0,32 ^a	20,96 $\pm$ 0,26 ^a

^a, ^b= médias de uma mesma linha seguidas por letras diferentes diferem significativamente em relação ao grupo controle em cada período do experimento.

A avaliação do conteúdo de ácido oxálico apresentou uma diminuição significativa e progressiva em 5,65% aos 10 d.p.i, 20,57% aos 20 d.p.i., 27,92% aos 30 d.p.i e 27,90% aos 40 d.p.i. nos moluscos infectados em comparação com os moluscos controle (Tabela 3; Figura 2C).

O mesmo padrão descrito acima foi observado na comparação do conteúdo de ácido succínico entre moluscos infectados e não infectados. Decorridos 10 d.p.i., foi observada uma redução em 7,35%, aos 20 d.p.i. a redução foi em 8,43% seguida de uma redução de 8,5% aos 30 d.p.i. e de 9,03% aos 40 d.p.i. (Tabela 3; Figura 2D).

Tabela 3: Conteúdo de ácidos orgânicos (mM) presentes na hemolinfa de *Subulina octona* após a infecção experimental por *Paratanaisia bragai*, expressos como média $\pm$ desvio padrão.

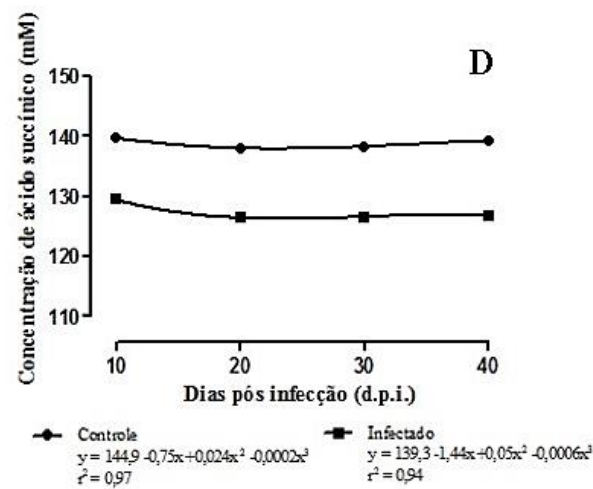
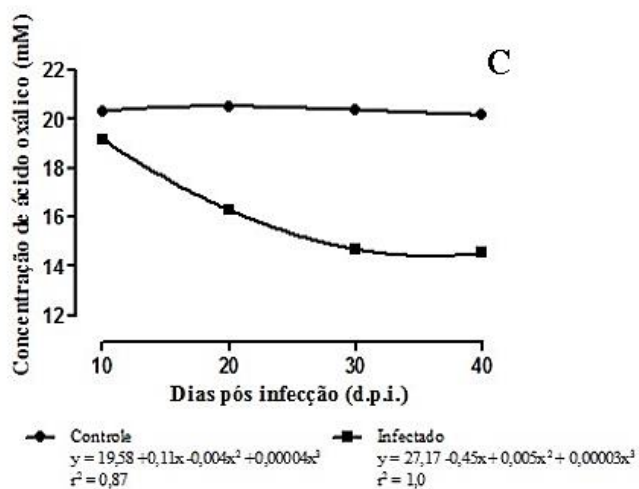
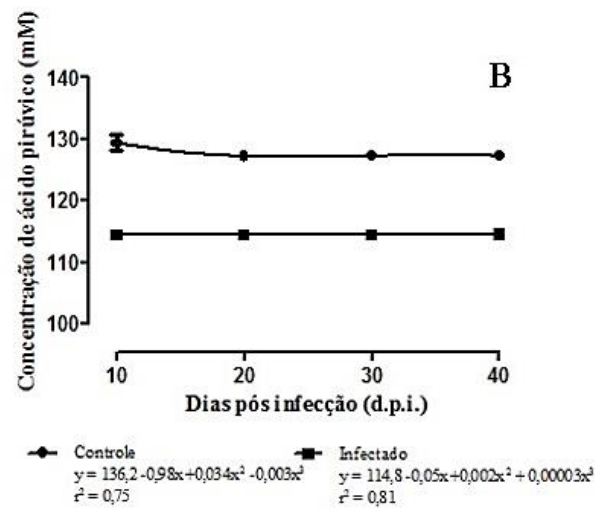
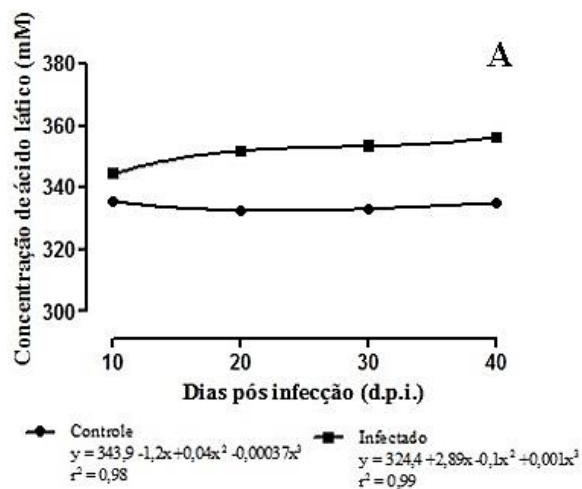
Dias pós infecção (d.p.i.)	Ácido Oxálico (mM)		Ácido Succínico (mM)		Ácido Pirúvico (mM)		Ácido Lático (mM)	
	Controle	Infectado	Controle	Infectado	Controle	Infectado	Controle	Infectado
10	20,34 $\pm$ 0,03 ^a	19,19 $\pm$ 0,05 ^b	139,69 $\pm$ 0,21 ^a	129,42 $\pm$ 0,75 ^b	129,47 $\pm$ 1,33 ^a	114,50 $\pm$ 0,02 ^b	335,43 $\pm$ 0,24 ^a	344,50 $\pm$ 0,12 ^b
20	20,52 $\pm$ 0,10 ^a	16,30 $\pm$ 0,05 ^b	137,91 $\pm$ 0,11 ^a	126,28 $\pm$ 0,05 ^b	127,25 $\pm$ 0,09 ^a	114,45 $\pm$ 0,02 ^b	332,55 $\pm$ 0,24 ^a	351,77 $\pm$ 0,39 ^b
30	20,38 $\pm$ 0,04 ^a	14,69 $\pm$ 0,12 ^b	138,21 $\pm$ 0,11 ^a	126,49 $\pm$ 0,13 ^b	127,29 $\pm$ 0,03 ^a	114,51 $\pm$ 0,01 ^b	333,10 $\pm$ 0,18 ^a	353,34 $\pm$ 0,21 ^b
40	20,18 $\pm$ 0,02 ^a	14,55 $\pm$ 0,02 ^b	139,20 $\pm$ 0,11 ^a	126,64 $\pm$ 0,08 ^b	127,30 $\pm$ 0,03 ^a	114,52 $\pm$ 0,01 ^b	334,88 $\pm$ 0,06 ^a	356,37 $\pm$ 0,18 ^b

^{a,b}= médias de uma mesma linha seguidas por letras diferentes diferem significativamente em relação ao grupo controle em cada período do experimento.

Em relação ao conteúdo de ácido pirúvico, também foi observada uma redução significativa em 11,56%, 10,06%, 10,04% e 10,04% aos 10 d.p.i., 20 d.p.i., 30 d.p.i. e 40 d.p.i., respectivamente (Tabela 3; Figura 2B).

Ao analisar a quantidade de ácido lático presente na hemolinfa, observamos o aumento significativo e progressivo de 2,7% aos 10 d.p.i., seguido de 5,78% aos 20 d.p.i., 6,08% aos 30 d.p.i. e de 6,42% decorridos 40 d.p.i. (Tabela 3; Figura 2A).

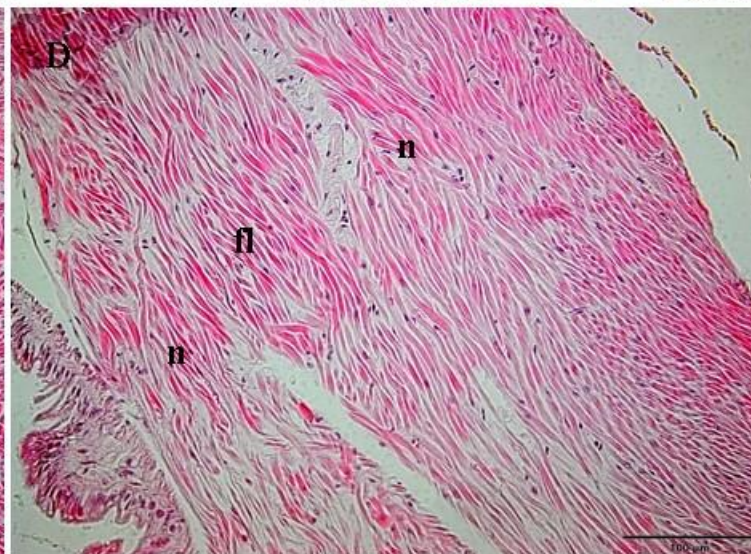
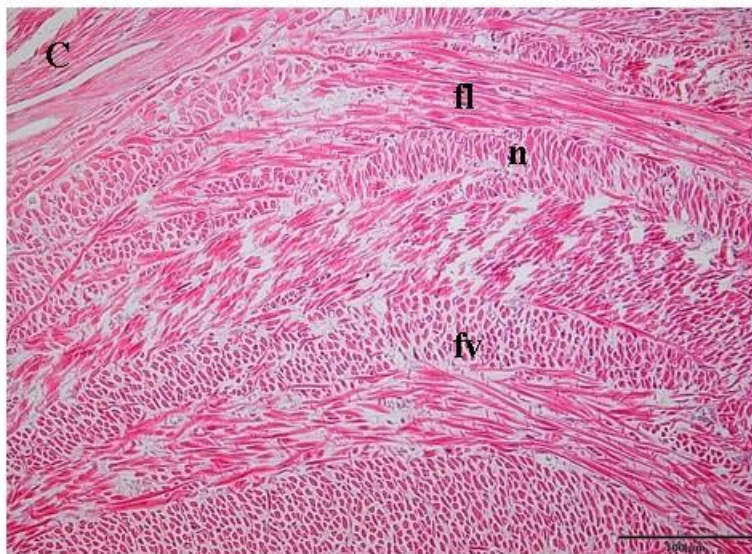
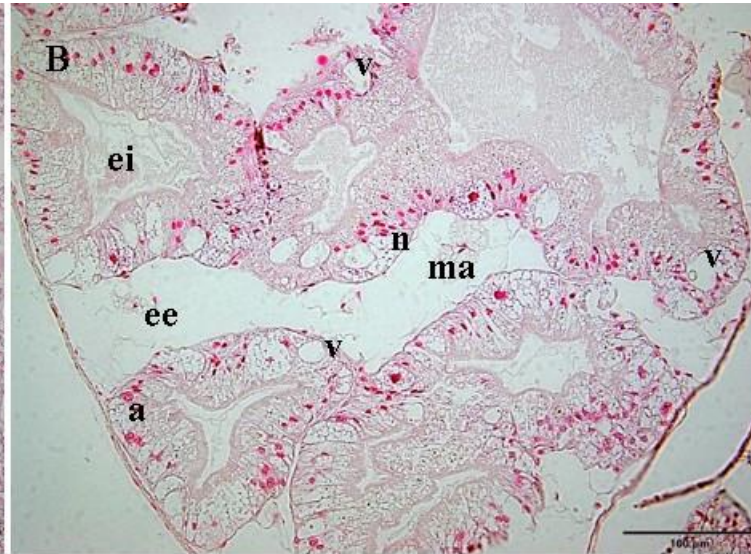
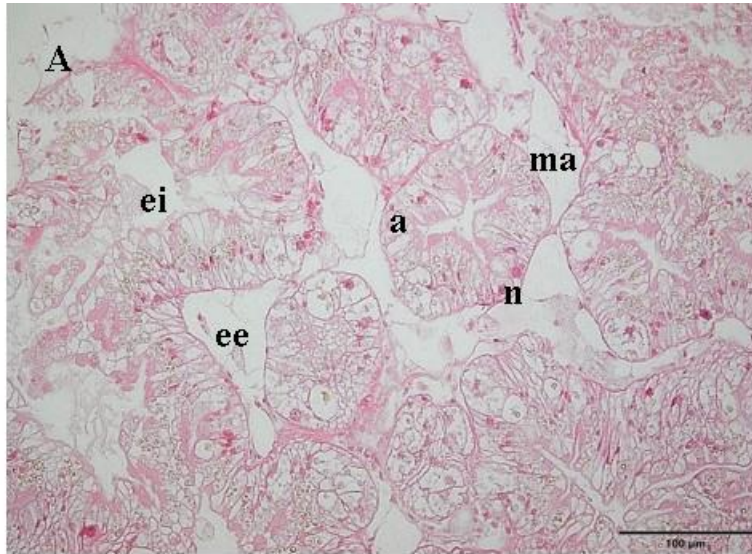
Figura 2: Relação entre o conteúdo de ácidos orgânicos (mM) na hemolinfa de *Subulina octona* infectada experimentalmente por *Paratanaisia bragai* e o tempo pós-infecção. A) Concentração de ácido láctico (lactato). B) Concentração de ácido pirúvico (piruvato). C) Concentração de ácido oxálico (oxalato). D) Concentração de ácido succínico (succinato).



Na análise histológica da glândula digestiva dos moluscos controle observa-se células bem delimitadas com núcleos regulares e ácinos com pouco tecido conjuntivo entre eles. O epitélio possui pouca vacuolização e reduzida quantidade de material amorfo intra acinar (Figura 3A). Porém, ao analisar o mesmo tecido em um molusco infectado podemos verificar um aumento do espaço intra acinar e elevada vacuolização nas células acinares; há aumento significativo da quantidade de material amorfo intra e interacinar, as células não apresentavam limites bem definidos, porém contavam com intensa vacuolização (Figuras 3B).

Os tecidos da massa cefalopediosa dos moluscos controle mostraram uma organização das fibras musculares em arranjos de feixes longitudinais e verticais, com intensa marcação de glicogênio ao longo de todo o tecido analisado (Figura 3C). Nos animais infectados, observamos a perda da organização dos feixes perpendiculares, sendo observados apenas os feixes longitudinais, afrouxamento da disposição das fibras e dispersão de núcleos no tecido, os quais se mostram mais cromafins do que no molusco não infectado. Em decorrência do afrouxamento do arranjo das fibras musculares, houve uma marcação menos intensa do glicogênio muscular pela técnica do PAS (Figura 3D).

Figura 3: Corte histológico do molusco *Subulina octona*. A) Glândula digestiva de um molusco não infectado. Barra da escala = 100 µm. B) Glândula digestiva de um molusco infectado pelo trematódeo *Paratanaisia bragai*, onde estão indicados ácinos (a), núcleo (n), lúmen com presença de material amorfo (ma), vacúolos (v), espaços intraacinares (ei) e interacinares (ee). Barra da escala = 100 µm. C) Massa cefalopediosa de *Subulina octona* não infectada. Barra da escala = 100 µm. D) Massa cefalopediosa de um molusco infectado por *Paratanaisia bragai* com indicação dos feixes de fibras musculares longitudinais (fl) e verticais (fv) e núcleos (n). Barra da escala = 100 µm. Coloração: Ácido Periódico-Schiff (PAS).



4 DISCUSSÃO

Ao atingir o hospedeiro intermediário, as larvas de trematódeos induzem mudanças significativas no padrão metabólico do molusco hospedeiro, pois passam a competir diretamente por nutrientes e utilizá-los para o seu desenvolvimento. Além disso, ocorre a liberação de produtos de excreção/secreção do parasito (BECKER, 1980), alterando a composição da hemolinfa.

Alterações no metabolismo de carboidratos são frequentemente observadas em moluscos infectados, principalmente em gastrópodes pulmonados nos quais o metabolismo energético é mantido essencialmente através do consumo de glicose (JOOSSE, 1988). No entanto, quando os moluscos são expostos a condições fisiológicas adversas, como o jejum e o parasitismo, ele pode usar substratos alternativos, como lipídios e proteínas para produzir energia (BONFIM et al., 2014; TUNHOLI et al., 2011; TUNHOLI-ALVES et al., 2011)

Os moluscos utilizam suas reservas polissacarídicas na tentativa de reestabelecer a normoglicemia. O glicogênio, cujos principais locais de armazenamento são a glândula digestiva e o tecido muscular, passa então a ser mobilizado, pois a partir da sua degradação ocorre a liberação de metabólitos que podem ser convertidos rapidamente em glicose livre, o que auxilia na regulação do balanço energético (PINHEIRO et al., 2009; PINHEIRO; AMATO, 1994). No presente estudo, a quantidade de glicose na hemolinfa nos moluscos infectados foi maior que a dos moluscos controle em todos os períodos analisados, indicando que há uma mobilização maior de glicose e o molusco precisa produzir mais intensamente esse monossacarídeo. No entanto, o conteúdo de glicogênio tanto da massa cefalopediosa quanto da glândula digestiva apresentaram padrões alternantes entre os períodos observados, ou seja, aos 10 d.p.i. foi observado um aumento nesses parâmetros, que foi seguido por uma diminuição aos 20 d.p.i., aos 30 d.p.i. um novo aumento foi observado nos dois parâmetros e, por fim, aos 40 d.p.i. foi observada uma diminuição no conteúdo de glicogênio na massa cefalopediosa e um aumento no conteúdo de glicogênio presente na glândula digestiva. Esse comportamento indica que a manutenção das altas concentrações de glicose nos moluscos infectados não tem como origem a degradação das reservas de glicogênio presentes na massa cefalopediosa e na glândula digestiva.

Esse cenário metabólico indica um processo de síntese *de novo* de glicose, através da gliconeogênese, em resposta aos distúrbios causados pelo parasitismo, resultando em um redirecionamento das rotas metabólicas utilizando aminoácidos ou lipídeos como substratos energéticos (TUNHOLI-ALVES et al., 2014; LIMA et al., 2016). Dessa forma, há a produção de glicose a partir de substratos não-glicídicos, para manter a glicemia do molusco hospedeiro (PINHEIRO et al., 2009).

Na tentativa de compreender melhor o metabolismo energético de *S. octona* frente à infecção por *P. bragai*, as concentrações de alguns ácidos orgânicos que participam do ciclo de Krebs foram analisadas. A diminuição progressiva dos conteúdos de ácido pirúvico nos moluscos infectados associados ao aumento do conteúdo de ácido láctico e aos valores aumentados da LDH aos 10 d.p.i. e aos 40 d.p.i indicam a aceleração do metabolismo anaeróbio, pois o piruvato está sendo convertido a lactato pela ação da LDH e está ativando a via fermentativa garantindo a obtenção de energia através da redução do ácido pirúvico em ácido láctico e a reoxidação do NADH^+ (LIMA et al., 2016).

A redução nos níveis de ácido oxálico nos moluscos infectados pode ser explicada pelo redirecionamento desse ácido para a gliconeogênese (TUNHOLI et al., 2013) e pelo uso dessa molécula como um substrato necessário para o desenvolvimento larval do parasito. Massa e colaboradores (2007) ao estudarem o modelo *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818)/*Schistosoma mansoni* Sambom, 1907 observaram o uso de alguns ácidos orgânicos, especialmente o ácido oxálico como um substrato necessário para o desenvolvimento de esporocistos e cercárias.

Já a redução da quantidade de ácido succínico presente na hemolinfa dos moluscos infectados pode ser explicada pela metabolização do succinato em propionato, que gera energia e ajuda a manter o balanço redox. Essa reação colabora para a redução dos níveis de ácido succínico e, conseqüentemente, a manutenção do pH (TUNHOLI-ALVES et al., 2014).

Os resultados da análise histoquímica indicam um intenso processo de lesão e desorganização tecidual na glândula digestiva. Brandolini e Amato (2006) ao estudar o desenvolvimento larval de *P. bragai*, verificaram a presença de esporocistos, cercárias e metacercárias na glândula digestiva dos moluscos parasitados. Apesar desses estágios larvais não terem sido observados nas imagens obtidas através da histoquímica no presente estudo,

essas alterações evidenciam que os parasitos podem causar alterações através de mecanismos indiretos na organização e, possivelmente, na função da glândula digestiva.

Na massa cefalopediosa, a análise da histologia revelou que a organização tecidual foi comprometida nos moluscos infectados, pois as fibras musculares se apresentavam dispersas e desorganizadas. Além disso, os núcleos celulares apresentavam-se dispersos entre as fibras musculares e com aumento da afinidade cromática. Esse resultado indica que apesar de não fazer uso significativo das reservas de glicogênio presentes nesse tecido para manutenção da normoglicemia, as oscilações observadas no conteúdo de carboidratos entre os períodos analisados causaram alterações nas características histológicas do tecido muscular dos moluscos.

Esses resultados confirmaram que a infecção provocou mudanças na via metabólica utilizada pelo molusco pois o metabolismo aeróbio foi diminuído e ocorreu a ativação de uma via anaeróbica alternativa para a obtenção de energia, a fermentação láctica. Esta é uma resposta fisiológica interessante e importante pois produz energia e metabólitos fundamentais para a sobrevivência do molusco e desenvolvimento larval do parasito. Além disso, também foi observado que a obtenção de glicose nos moluscos infectados está ocorrendo através do uso de substratos não-glicídicos que podem ser de origem proteica ou lipídica, caracterizando o processo conhecido como gliconeogênese, necessitando de estudos posteriores capazes de esclarecer ainda mais essa estratégia.

De forma conclusiva, podemos observar que em face do estabelecimento da infecção com o ingresso dos miracídios no corpo do molusco e o início da rápida multiplicação assexuada das larvas desenvolvimento, elevam a demanda energética de forma significativa pelo para larvas em desenvolvimento-molusco hospedeiro. Segundo Livingstone e de Zwaan (1983), os carboidratos são os substratos mais prontamente utilizáveis para a obtenção de energia metabólica pelos moluscos em geral. Contudo, no caso do sistema *P. bragai*/*S. octona* observamos a elevação da glicemia em todos os períodos de infecção estudados e padrão oscilante de variação nos depósitos de glicogênio analisados, com elevações na glicemia e nos conteúdos de glicogênio aos 10 dias de infecção. Neste mesmo período observa-se elevação da atividade da LDH e da concentração de lactato e reduções nas quantidades de oxalato e succinato, indicando um desvio metabólico no sentido de reduzir a atividade do metabolismo

oxidativo mitocondrial e elevar a atividade fermentativa no sentido de degradar o piruvato para formação de lactato, com garantias de produção rápida, apesar de menos rentável, de energia e de reoxidação dos aceptores de elétrons (NAD^+). Porém, os depósitos de glicogênio não são reduzidos, apesar da elevada demanda glicolítica com o destino anaeróbio da fermentação láctica. Tal fato, pode ser explicado pelo fornecimento de alimento em proporção acima do consumo para os moluscos, apesar de não ter havido a quantificação do consumo alimentar, este é o fator que pode ser apontado como provável explicação para a não redução dos depósitos de glicogênio, quando há aumento da glicemia e da atividade anaeróbia para obtenção de energia livre. O mesmo padrão se repete aos 30 dias de infecção, quando há a formação das cercárias no interior dos esporocistos, outro ponto de elevada atividade de reprodução assexuada no desenvolvimento larval intramolusco.

Inversamente, aos 20 observa-se a manutenção da hiperglicemia, com consequente redução nos depósitos de glicogênio, e a atividade da LDH sendo reduzida a quase metade do valor observado aos 10 dias de infecção. Considerando que neste período do ciclo temos a formação dos esporocistos de 1ª e 2ª geração etapas com redução da demanda energética pelas larvas em desenvolvimento por não ocorrer intensa multiplicação assexuada. Contudo, o metabolismo oxidativo mitocondrial permanece inibido e a degradação anaeróbia do piruvato segue estimulada, em relação aos moluscos controle, apesar da redução da atividade da LDH.

Aos 40 dias, quando já começa a se dar a formação das metacercárias, observa-se que a redução significativa da demanda energética pelas larvas em desenvolvimento, uma vez que as metacercárias se encistam no interior do molusco, reduzindo sua atividade metabólica até que o ciclo de vida possa ter seu prosseguimento. Há, então, uma elevação abrupta da glicemia (156,9%, em relação aos moluscos não infectados e de 137,5% em relação aos valores observados aos 30 dias de infecção), o que, por fim, provoca a redução nos depósitos de glicogênio, uma vez que a glicose se mantém circulante na hemolinfa e não é direcionada para os sítios de polimerização para formação de glicogênio.

A infecção de *B. glabrata* com *A. cantonensis* (TUNHOLI-ALVES et al., 2019) e com *Echinostoma paraensei* (TUNHOLI et al., 2016) observaram que a adição de succinato e ADP aos tecidos da glândula digestiva dos moluscos, provoca a elevação do consumo de oxigênio, evidenciando uma tendência à recuperação do metabolismo oxidativo mitocondrial ao final do

período pré patente nestes sistemas estudados. Diferentemente, no sistema estudado no presente trabalho, não observamos ao final do período pré patente a tendência à retomada do metabolismo oxidativo mitocondrial, uma vez que os conteúdos de oxalato e succinato permanecem significativamente menores do que nos moluscos não infectados.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BECKER, W. Metabolic interrelationship of parasite trematodes and molluscs, especially *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*. **Zeitschrift for Parasitenkunde**, v. 63, p. 101-111, 1980.
- BONFIM, T. C. S.; MALDONADO, A.; TUNHOLI, V. M.; TUNHOLI-ALVES, V. M.; FARO, M. J.; MOTA, E. M.; SILVA, T. C. B. S.; PINHEIRO, J.; GARCIA, J. S. Biochemical and histopathological alterations in *Biomphalaria glabrata* due to co-infection by *Angiostrongylus cantonensis* and *Echinostoma paraensei*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 115, p. 80 – 85, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2013.10.005>
- BRANDOLINI, S. V. P. B.; AMATO, S. B. Desenvolvimento larval de *Paratanaisia bragai* (Santos) (Digenea, Eucotylidae) sob condições experimentais. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 23, n. 4, p. 1097-1100, 2006. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-81752006000400017>.
- BRANDOLINI, S. V. P. B.; AMATO, S. B.; PEREIRA, A. A. Relacionamento de *Tanaisia bragai* (Digenea, Eucotylidae) e seu hospedeiro intermediário, *Subulina octona* (Gastropoda, Subulinidae) sob condições experimentais. **Parasitología al día**, v. 21, p. 109-113, 1997. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-07201997000300008>.
- FERNANDES, M. C. **Métodos escolhidos de técnicas microscópicas**. 2ed. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1949.
- HUMASON, G. L. **Animal Tissue Techniques**. 4 ed. San Francisco: W.H. Freeman, 1979.
- JOOSSE, J. Hormone mollusks. In: JAFER, H.; DWER, R.G.H. **Invertebrate Endocrinology**. New York, USA, 1988.
- KELLER, G. G.; ARAÚJO, J. L. B. Ciclo evolutivo de *Paratanaisia bragai* (Santos, 1934) (Trematoda, Eucotylidae) como novo hospedeiro intermediário no Brasil: *Leptinaria unilamellata* (D'Orbigny, 1835) (Gastropoda, Pulmonata, Subulinidae) em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 1, n. 2, p. 89 – 92, 1992.
- LIMA, M. G.; TUNHOLI-ALVES, V. M.; GAUDÊNCIO, F. G.; MARTINS, F. G.; CASTRO, R. N.; THIENGO, S. C.; GARCIA, J. S.; MALDONADO, A.; PINHEIRO, J. The influence of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda, Metastrongylidae) infection on the aerobic metabolism of *Biomphalaria straminea* and *Biomphalaria tenagophila* (Mollusca, Gastropoda). **Experimental Parasitology**, v. 171, p. 1-9, 2016. DOI:10.1016/j.exppara.2016.10.010

LIVINGSTONE D. R; DE ZWAAN, A. Carbohydrate metabolism of gastropods. In: HOCHACHKA; P. W. The mollusca metabolic biochemistry and molecular biomechanics, **Academic Press**, London, p. 177-242, 1983.

MALDONADO, J. F. The life cycle of *Tamerlania bragai*, Santos, 1934 (Eucotylidae), a kidney fluke of domestic pigeons. **Journal of Parasitology**, v. 31, n. 5, p. 306 – 314, 1945. <http://dx.doi.org/10.2307/3273085>.

MASSA, D. R.; CHEJLAVA, M. J.; FRIED, B.; SHERMA, J. High performance column liquid chromatographic analysis of selected carboxylic acids in *Biomphalaria glabrata* patently infected with *Schistosoma mansoni*. **Parasitology Research**, v. 101, p. 925-928, 2007. DOI: 10.1007/s00436-007-0563-2

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. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761994000300020>

PINHEIRO, J.; GOMES, E. M. A method for glycogen determination in molluscs. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 37, n. 3, p. 569 – 576, 1994.

PINHEIRO, J.; MALDONADO, A. J. R.; LANFREDI, R. M. Physiological changes in *Lymnaea columela* (Say, 1818) (Mollusca, Gastropoda) in response to *Echinostoma paraensei* Lie and basch, 1967 (Trematoda, Echinostomatidae) infection. **Parasitology Research**, v. 106, p. 55-59, 2009. DOI: 10.1007/s00436-009-1630-7

SANTI, M.; COUTO, C.; WERTHER, K. Occurrence of *Paratanaisia* spp. Freitas, 1951 in a domiciled cockatiel (*Nymphicus hollandicus*, Psittaciformes: Cacatuidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 27, n. 4, p. 575- 578, 2018. <https://doi.org/10.1590/S1984-296120180034>.

SCIENTIFIC COMMITTEE. Recommendations pour la mesure de la concentration catalytique de la lactate deshydrogenase dans le serum humain a 30 °C. **Annales de Biologie Clinique**, v. 40, p. 87-164, 1982.

SOCIEDAD ESPAÑOLA DE QUÍMICA CLÍNICA – SEQC. Comité Científico, Comisión de Enzimas. Método recomendado para La determinación en rutina de La concentración catalítica de lactato deshydrogenasa em suero sanguíneo humano. **Química Clínica**, v. 8, p. 57-61, 1989.

SUMNER, J. B. A method for colorimetric determination for phosphorus. **Science**, v. 2601, n. 100, p. 413 – 414, 1924.

TRINDER, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 6, n. 1, p. 24-27, 1969. <http://dx.doi.org/10.1177/000456326900600108>.

TUNHOLI, V. M.; TUNHOLI-ALVES, V. M.; LUSTRINO, D.; CASTRO, R. N.; SANT'ANA, L.; GARCIA, J. S.; MALDONADO, A.; SANTOS, M. A. J.; RODRIGUES, M. L. A.; PINHEIRO, J. Aerobic to anaerobic transition in *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) infected with different miracidial doses of *Echinostoma paraensei* (Lie and Basch, 1967) by high-performance liquid chromatography. **Experimental Parasitology**, v. 133, p. 403-410, 2013. doi: 10.1016/j.exppara.2013.01.012

TUNHOLI, V. M. A.; LUSTRINO, D.; TUNHOLI-ALVES, V. M.; GARCIA, J. S.; MELLO-SILVA, C. C.; MALDONADO, A.; RODRIGUES, M. L. A.; PINHEIRO, J. Influence of *Echinostoma paraensei* (Lie & Basch, 1967) infection on calcium content in *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Experimental Parasitology**, v. 129, p. 222-226, 2011. DOI: 10.1016/j.exppara.2011.07.016

TUNHOLI, V. M.; TUNHOLI-ALVES, V. M.; SANTOS, A. T.; GARCIA, J. S.; MALDONADO, A. JR.; DA-SILVA, W. S.; RODRIGUES, M. DE L.; PINHEIRO, J. Evaluation of the mitochondrial system in the gonad-digestive gland complex of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca, Gastropoda) after infection by *Echinostoma paraensei* (Trematoda, Echinostomatidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 136, p. 136-141, 2016.

TUNHOLI-ALVES, V. M.; TUNHOLI, V. M.; CASTRO, N.; SANT'ANA, L. O.; SANTOS-AMARAL, L.; OLIVEIRA, A. P. M.; GARCIA, J.; THIENGO, S. C.; PINHEIRO, J.; MALDONADO, A. Activation of anaerobic metabolism in *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Gastropoda) experimentally infected by *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda, Metastrongylidae) by high-performance. **Parasitology International**, v. 63, p. 64-68, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2013.09.004>

TUNHOLI-ALVES, V. M.; TUNHOLI, V. M.; LUSTRINO, D.; SANTOS-AMARAL, L.; THIENGO, S. C.; PINHEIRO, J. Changes in the reproductive biology of *Biomphalaria glabrata* experimentally infected with the nematode *Angiostrongylus cantonensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 108, p. 220-223, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2011.08.009>

TUNHOLI-ALVES, V. M.; TUNHOLI, V. M.; AMARAL, L. S.; GARCIA, J. S.; LIMA, M. G.; DA MATTA, R.; PINHEIRO, J. Alterations in the mitochondrial physiology of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Gastropoda) after experimental infection by *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongylidae). **Acta Parasitologica**, v. 64, n. 4, p. 693-699, 2019.

VILLELA, G. G.; BACILA, M.; TASTALDI, H. **Técnicas e experimentos de bioquímica**. Guanabara Koogan, 1973.

XAVIER, V. B. **Morfologia de ovos, larvas e adultos de *Paratanaisia bragai* (Santos, 1934) Freitas, 1959 (Digenea, Eucotylidae) e histopatologia do rim de *Columba livia* (Gm.) infectado.** 2015. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Instituto de Medicina Veterinária, Departamento de Parasitologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, 2015.

CAPÍTULO III

**EFEITOS DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *PARATANAISIA BRAGAI*
(DIGENEA, EUCOTYLIDAE) SOBRE O METABOLISMO DE PRODUTOS
NITROGENADOS E ASPECTOS FISIOLÓGICOS RELACIONADOS EM SEU
HOSPEDEIRO INTERMEDIÁRIO EXPERIMENTAL *SUBULINA OCTONA*
(GASTROPODA, SUBULINIDAE)**

RESUMO

Frente a condições adversas como o parasitismo, os moluscos tentam manter o equilíbrio homeostático, fazendo uso de diferentes estratégias, como a utilização de proteínas como substrato energético. Porém, essa estratégia faz com que o molusco precise lidar com aumentos em seus produtos nitrogenados de excreção. O objetivo desse estudo foi verificar as alterações causadas pela infecção experimental por *Paratanaisia bragai* no conteúdo de proteínas totais, ureia e ácido úrico, assim como na 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) presentes na hemolinfa do molusco terrestre *Subulina octona*, durante 40 dias. Espécimes de *S. octona* foram expostos individualmente durante 24 horas a 20 ovos de *P. bragai* e quatro grupos foram formados (10, 20, 30 e 40 d.p.i.), grupos controle contendo moluscos não infectados também foram formados. A cada 10 dias, os moluscos eram necropsiados para a coleta de hemolinfa. Aumentos significativos foram observados na concentração de proteínas totais, ureia e ácido úrico circulantes na hemolinfa. Em relação as transaminases, foi observado o aumento na atividade de ALT em todos os pontos de análises, assim como para a atividade de AST aos 10 d.p.i. e aos 20 d.p.i. A atividade aumentada das aminotransferases indicam uma ação espoliativa das larvas no tecido dos moluscos causando intenso dano tecidual e extravasamento enzimático para a hemolinfa circulante. Proteínas também extravasam e são aproveitadas para a realização da gliconeogênese e, em decorrência da utilização de esqueletos carbônicos provenientes de aminoácidos, ocorre o aumento na concentração de produtos nitrogenados de excreção. Apesar de uricotélicos, os moluscos infectados passam a excretar maior quantidade de ureia na tentativa de eliminar tais substâncias tóxicas da hemolinfa circulante. Observa-se que a gliconeogênese, utilizando proteínas como substrato energético, é um processo intensamente utilizado pelo molusco mas que gera alterações expressivas no conteúdos dos produtos nitrogenados de excreção, o que modifica a composição hemolinfática e a homeostase do hospedeiro.

Palavras-chave: produtos nitrogenados de excreção, gliconeogênese e aminotransferases.

ABSTRACT

Faced to adverse conditions such as parasitism, snails try to maintain their homeostatic balance, using emergency reactions, such as the use of proteins as energy substrate. However, this strategy means that the snail needs to deal with increases in its nitrogen excretion products. The objective of this study was to verify the changes caused by experimental infection by *P. bragai* in the content of total proteins, urea and uric acid, as well as in the activity of L-aspartate: 2-oxoglutarate aminotransferase (EC2.6.1.1) (AST) and L-alanine: 2-oxoglutarate aminotransferase (EC2.6.1.2) (ALT) present in the hemolymph of the terrestrial snail *S. octona*, for 40 days. Specimens of *S. octona* were individually exposed for 24 hours to 20 *P. bragai* eggs and four groups were formed (10, 20, 30 and 40 d.p.i.), control groups containing uninfected snails were also formed. Every 10 days, the snails were necropsied for the collection of hemolymph. Significant increases were observed in the concentration of total proteins, urea and uric acid circulating in the hemolymph. Regarding transaminases, an increase in ALT activity was observed at all points of analysis, as well as for AST activity at 10 d.p.i. and at 20 d.p.i. The increased value of the aminotransferases indicates a spoliative action of the larvae under the snail tissue causing intense tissue damage and protein leakage to the circulating hemolymph. These proteins are used to carry out gluconeogenesis and, due to the use of carbonic skeletons from amino acids, there is an increase in the production of nitrogenous excreta. Despite being ureotelic, snails start to excrete more uric acid in an attempt to eliminate such toxic substances from circulating hemolymph.

Keywords: nitrogen excreta, gluconeogenesis and aminotransferases.

1 INTRODUÇÃO

Paratanaisia bragai (Santos, 1934) é um digenético que possui ciclo biológico heteróximo, com moluscos gastrópodes atuando como hospedeiros intermediários e aves como hospedeiros definitivos. Para adquirir a infecção, as aves devem ingerir o estágio infectante de metacercária encistada, presente nos moluscos. Já os moluscos adquirem a infecção através da ingestão de ovos do parasito eliminados nos produtos de excreção das aves infectadas (SANTI et al., 2018).

Apesar de ser considerado pouco patogênico, sérias complicações clínicas podem ser observadas em aves com infecções intensas, que variam de acordo com a suscetibilidade dos animais à infecção e formação de lesões, possivelmente relacionadas à espécie e à idade dos animais infectados (UNWIN et al., 2013). Sendo assim, é importante o fornecimento de mais dados sobre essa espécie de trematódeo no intuito de evitar perdas econômicas associadas ao comércio de aves de produção e aves de companhia e, considerando o contrabando de espécies de aves tropicais e a sua capacidade de migração, evitar a dispersão do parasito.

Desde a sua descrição, *P. bragai* tem sido registrada em diferentes espécies de aves pertencentes as ordens Columbiformes, Galliformes, Passeriformes, Psittaciformes (SANTI et al., 2017). A maioria das publicações são registros de ocorrência do parasito em aves de vida livre, zoológicos e aves de companhia (SANTI et al., 2018). A escassez de estudos sobre a biologia e comportamento do parasito em seus hospedeiros, tem dificultado a adoção de medidas de controle da parasitose por ele provocada.

Estudos prévios relatam que, no Brasil, as espécies de moluscos *Leptinaria unilamellata* (D'Orbigni, 1835) e *Subulina octona* (Brugüière, 1789) atuam como hospedeiros intermediários de *P. bragai* (KELLER; ARAÚJO, 1992; BRANDOLINI; AMATO, 2006). A literatura encontrada sobre *S. octona* possui como objetivos esclarecer aspectos conquiológicos, questões de sinonímia, distribuição geográfica, aspectos morfológicos, histológicos e comportamentais, desenvolvimento de moluscidas (BESSA; ARAÚJO, 1995; ALMEIDA; MOTA, 2011, FERREIRA et al., 2009), poucos foram os trabalhos com enfoque parasitológico (BRANDOLINI et al., 1997; BRANDOLINI; AMATO, 2006; CALDEIRA et al., 2007, XAVIER, 2015).

Os moluscos utilizam carboidratos como principal fonte energética para a manutenção dos processos metabólicos e reprodutivos. No entanto, quando expostos a condições de estresse, como a estivação e o parasitismo por larvas de trematódeos, outros substratos podem ser usados para a mesma finalidade (PINHEIRO et al., 2001). Como consequência da competição pelas fontes glicídicas e na tentativa de manter o equilíbrio homeostático, reações emergenciais podem ser observadas, tais como a utilização de proteínas como substrato energético. Porém, o efeito da utilização do esqueleto carbônico de aminoácidos faz com que o molusco precise lidar com um aumento nos conteúdos de amônia, ácido úrico e ureia, que são seus produtos nitrogenados de excreção (PINHEIRO et al., 2009).

Alterações causadas pela infecção por *P. bragai* na atividade reprodutiva e no metabolismo de carboidratos foram previamente estudadas em *S. octona*. Portanto, o objetivo desse estudo foi elucidar as alterações nos padrões do metabolismo dos produtos nitrogenados de excreção para melhor entender o cenário metabólico e as alterações causadas pela infecção por *P. bragai* em seu hospedeiro intermediário *S. octona* através da análise do conteúdo de proteínas totais, ureia e ácido úrico, assim como na 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), durante 40 dias após a infecção.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A obtenção dos moluscos aptos para a infecção e dos ovos do parasito foi realizada como descrito previamente no item 3 Metodologia Geral, encontrada na página 31.

2.1 Coleta e processamento das amostras

A cada 10 dias, durante 40 dias, um grupo de moluscos controle e um grupo infectado eram necropsiados e dissecados para a coleta de hemolinfa. A hemolinfa foi coletada em banho de gelo através da remoção do ápice da concha, o material extravasado era gotejado diretamente sob um microtubo eppendorf com capacidade para 1,5 ml, identificado e armazenado a -20°C até sua utilização.

A concentração de proteínas totais, ureia e ácido úrico, assim como a atividade da *L*-aspartato:2-oxoglutarato aminotransferase (aspartato aminotransferase - AST) e *L*-alanina:2-oxoglutarato aminotransferase (alanina aminotransferase - ALT), presentes na hemolinfa dos moluscos foi determinada utilizando um analisador automático A15 (Biosystems®). Os kits de reagentes para a determinação da concentração de proteínas, ureia, ácido úrico e atividade de AST e ALT eram da mesma fabricante do equipamento (Biosystems®). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Para a determinação da concentração de proteínas totais, 20 µL de amostra foram adicionados a 1mL de reagente de cor (acetado de cobre (III) 6mmol/L, iodeto de potássio 12 mmol/L, hidróxido de sódio 1,15 mol/L, detergente). O padrão usado foi albumina sérica bovina, na concentração de 50 g/L. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 540 nm, e os resultados expressos em g/L (GORNALL et al., 1949).

Para a avaliação da concentração de ureia, 10 µL de amostra foram adicionados a 1,5mL do reagente de cor (Tris 100mmol/L, 2-oxoglutarato 5,6mmol/L, urease > 140U/mL, glutamato desidrogenase > 140U/mL, etilenglicol 200g/L, azida sódica 0,95g/L, pH 8,0, NADH 1,5mmol/L, azida sódica 9,5g/L). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro aos 340 nm, e os resultados expressos em mg/dL (GUTMANN; BERGMEYER, 1974).

A determinação do ácido úrico foi realizada adicionando-se 25 µL de amostra a 1mL de reagente de cor (fosfatos 100mmol/L, detergente 1,5g/L, diclorofenolsulfonato 4mmol/L, uricase > 0,12U/mL, ascorbato oxidase > 5U/mL, peroxidase > 1U/mL, 4-aminoantipirina 0,5 mmol/L, pH 7,8). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 520 nm, e os resultados expressos em g/L (FOSSATTI et al., 1980).

Para a avaliação da atividade enzimática de ALT, 50 µL de amostra diluída foram adicionados a 1mL de reagente (Tris 150 mmol/L, L-alanina 750 mmol/L, desidrogenase láctica > 1350 U/L, pH 7,3, NADH 1,9 mmol/L, 2-oxoglutarato 75 mmol/L, hidróxido de sódio 148 mmol/L, azida sódica 9,5 g/L). O produto formado foi determinado por espectrofotometria no comprimento de onda de 340 nm, expressos em U/L (SOCIEDAD ESPAÑOLA DE QUÍMICA CLÍNICA, 1987; GELLA et al., 1985).

Para a avaliação da atividade enzimática da AST, 50µL de amostra foram adicionados a 1mL de reagente (Tris 121 mmol/L, L-aspartato 362 mmol/L, desidrogenase málica > 460 U/L, desidrogenase láctica > 660 U/L, hidróxido de sódio 255mmol/L pH 7,8, NADH 1,9 mmol/L, 2- oxoglutarato 75 mmol/L, hidróxido de sódio 148 mmol/L, azida sódica 9,5 g/L). Os resultados, expressos em U/L, foram lidos em espectrofotômetro a 340 nm (SOCIEDAD ESPAÑOLA DE QUÍMICA CLÍNICA, 1987; GELLA et al., 1985).

2.2 Análise estatística

A concentração de proteínas totais, ureia e ácido úrico, assim como a atividade de ALT e AST foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (InStat, GraphPad v.4.00; Prism, GraphPad v.3.02, Prism Inc). A ANOVA foi realizada seguida pelo teste de Tukey para comparar as médias (InStat, GraphPad v.4.00; Prism, GraphPad v.3.02, Prism Inc).

A regressão polinomial de terceira ordem foi calculada para analisar a relação entre os valores obtidos e o tempo de infecção (Prism, GraphPad v.3.02, Prism Inc).

3 RESULTADOS

Em relação à quantidade de proteínas totais presentes na hemolinfa, foi observado um aumento significativo ($p < 0.001$) em +19,54% aos 10 d.p.i., + 21,59% aos 20 d.p.i. e +12,80 aos 40 d.p.i nos moluscos infectados pelo trematódeo em comparação com os moluscos controle (não-infectados). Aos 30 d.p.i., o aumento verificado foi de +4,76%. Somando as médias obtidas nos pontos de análise, podemos verificar um aumento de +14,51% na concentração de proteínas disponíveis na hemolinfa dos moluscos infectados em comparação aos moluscos controle (Tabela 1).

Foi verificado o aumento na concentração de ureia nos moluscos infectados em comparação ao controle em +72,63% ao comparar o somatório das médias obtidas. Ao verificar os valores decorridos 10, 20, 30 e 40 d.p.i, verificamos o aumento da ureia em +54,57%, +19,40%, +61,86% e +98,43, respectivamente. Porém, observamos diferença significativa ($p < 0.001$) na concentração de ureia entre moluscos infectados e controle apenas aos 40 d.p.i. (Tabela 1).

Um comportamento semelhante foi observado na avaliação do conteúdo de ácido úrico presente na hemolinfa, onde o aumento comparando as médias de todos os períodos analisados foi de +23,55%. Averiguando os resultados com os intervalos de 10 dias, vemos aos 10 d.p.i. um aumento em +21,28%, seguido por um aumento em + 35,53% aos 20d.p.i., de +21,25% aos 30 d.p.i. e +21,98% aos 40 d.p.i em comparação com os moluscos controle (não-infectados) (Tabela 1).

Tabela 1: Efeitos da infecção experimental por *Paratanaisia bragai* sobre a concentração de proteínas totais, ureia e ácido úrico de seu hospedeiro experimental *Subulina octona*, expressos em média $\pm$ desvio padrão da média, ao longo de 40 dias pós infecção (d.p.i.).

Dias após infecção (d.p.i.)	Proteínas totais (g/L)		Ureia (mg/dL)		Ácido Úrico (g/L)	
	Controle	Infectado	Controle	Infectado	Controle	Infectado
10	59,67 $\pm$ 2,08 ^a	71,33 $\pm$ 1,53 ^b	7,33 $\pm$ 2,52 ^a	11,33 $\pm$ 1,53 ^a	0,97 $\pm$ 0,08 ^a	1,14 $\pm$ 0,13 ^a
20	59,67 $\pm$ 1,53 ^a	72,67 $\pm$ 1,53 ^b	6,67 $\pm$ 1,16 ^a	8,0 $\pm$ 1,0 ^a	0,76 $\pm$ 0,07 ^a	1,03 $\pm$ 0,18 ^a
30	63,0 $\pm$ 2,0 ^a	66,0 $\pm$ 1,73 ^a	7,0 $\pm$ 1,41 ^a	11,33 $\pm$ 1,16 ^a	0,8 $\pm$ 0,15 ^a	0,97 $\pm$ 0,11 ^a
40	70,33 $\pm$ 0,58 ^a	79,33 $\pm$ 3,51 ^b	21,67 $\pm$ 2,08 ^a	43,0 $\pm$ 0 ^b	0,91 $\pm$ 0,06 ^a	1,11 $\pm$ 0,08 ^a
Σ das médias	252,67	289,33	42,67	73,66	3,44	4,25
Média Final	63,17	72,33	10,67	18,66	0,86	1,06

^{a,b} Médias de uma mesma linha seguidas por letras diferentes, diferem entre si ao nível de significância de, no mínimo, 5%, com diferenças significativas entre o grupo controle e o grupo infectado.

A atividade da enzima alanina aminotransferase mostrou-se significativamente aumentada ($p < 0.001$) nos moluscos infectados em comparação com o controle em todos os períodos observados. Sendo maior em +46,26% aos 10 d.p.i., +47,97% aos 20 d.p.i., +26,97% aos 30 d.p.i. e +96,45% aos 40 d.p.i. Quando somamos todas as médias obtidas durante o período de 40 dias, é possível verificar um aumento superior em 50% na atividade de ALT (53,2%) (Tabela 2).

No entanto, a atividade da enzima aspartato aminotransferase mostrou-se significativamente aumentada ($p < 0.001$) nos primeiros 10 d.p.i., com valor +44,42% superior nos moluscos infectados quando comparados com moluscos controle. Aos 20 d.p.i., o aumento foi de apenas +5,6%. Porém, aos 30 d.p.i., observamos a diminuição de atividade dessa enzima em -2,27%, seguido por uma diminuição significativa ($p < 0.001$) em -38,26% aos 40 d.p.i. nos moluscos infectados quando comparados com o controle (Tabela 2).

Tabela 2: Avaliação da atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) em *Subulina octona* experimentalmente infectada por *Paratanaisia bragai*. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão da média, ao longo de 40 dias pós infecção (d.p.i.).

Dias pós infecção (d.p.i.)	ALT (U/L)		AST (U/L)	
	Controle	Infectado	Controle	Infectado
10	147 $\pm$ 3,0 ^a	215 $\pm$ 7,07 ^b	415 $\pm$ 3,46 ^a	599,33 $\pm$ 3,79 ^b
20	232 $\pm$ 1,73 ^a	343,3 $\pm$ 6,11 ^b	513 $\pm$ 3,0 ^a	541,67 $\pm$ 42,02 ^a
30	241 $\pm$ 3,0 ^a	306 $\pm$ 5,2 ^b	692,67 $\pm$ 7,37 ^a	676,33 $\pm$ 6,11 ^a
40	197,67 $\pm$ 5,13 ^a	388,33 $\pm$ 12,22 ^b	636 $\pm$ 11,53 ^a	392,67 $\pm$ 25,66 ^b
Σ das médias	817,67	1252,63	2256,67	2210
Média Final	204,42	312,16	564,17	552,5

^{a,b} Médias de uma mesma linha seguidas por letras diferentes, diferem entre si ao nível de significância de, no mínimo, 5%, com diferenças significativas entre o grupo controle e o grupo infectado.

4 DISCUSSÃO

As aminotransferases analisadas nesse trabalho, sobretudo a ALT, indicam a existência de danos teciduais e apresentaram valores aumentados, sugerindo uma atividade histolítica indireta das formas larvais de *P. bragai*, pois como vimos em capítulos anteriores, os estágios larvais de *P. bragai* não foram observados nos tecidos do hospedeiro. Como consequência dessa intensa degradação tecidual, é extravasada para a hemolinfa uma quantidade elevada de proteínas constituintes dos tecidos danificados. Porém, a hiperproteinemia é uma condição desfavorável ao metabolismo do molusco, sendo necessária a utilização dessas moléculas. Uma das formas de aproveitamento desse material é utilizá-lo na gliconeogênese tendo como objetivo principal diminuir hiperproteinemia da hemolinfa e, em segundo plano, aumentar a liberação de intermediários glicídicos para a produção de energia.

Dictus e colaboradores (1987) observaram a existência de um neuropeptídeo, denominado calfluxina, em glândula de albúmem de *Lymnaea stagnalis*, o qual atua regulando o influxo de cálcio nas mitocôndrias. No presente estudo, a observação da redução da atividade oxidativa mitocondrial, leva a aceleração da degradação anaeróbia da glicose até lactato, elevando de forma significativa a redução de $\text{NAD}^+ \rightarrow \text{NADH.H}^+$ citossólico. A AST é uma enzima essencial para o funcionamento da lançadeira via malato que permite a reoxidação do NADH.H^+ produzido na reação catalisada pela gliceraldeído-3-fostato desidrogenase. Contudo a atuação da via malato, requer, além da atividade catalítica da AST, a ação sequencial da malato desidrogenase, pois o aspartato transportado da mitocôndria para o citossol precisa ser transaminado para formar oxaloacetato, o qual é reduzido a malato pela malato desidrogenase, reoxidando o NADH.H^+ , e sendo este malato transportado para o interior da mitocôndria.

Considerando que diversas isoformas de malato desidrogenase (BRENDA:EC1.1.1.37), o cálcio é um metal que atua como ativador da enzima, podemos compreender que, além das diferentes interpretações clínicas que a atividade da AST possa ter, no presente estudo, a elevação de sua atividade na hemolinfa pode estar associada não apenas ao dano tecidual causado pelas larvas de *P. bragai* em desenvolvimento, mas também à aceleração da lançadeira via malato, a qual está acoplada à reação catalisada pela enzima malato desidrogenase, que requer o íon Ca^{+2} como ativador.

A utilização das proteínas como substrato energético corrobora com resultados encontrados em capítulos anteriores, onde observamos que os moluscos não fazem uso de suas reservas glicídicas frente à infecção por *P. bragai*. Além disso, consequência do uso das proteínas extravazadas na hemolinfa, verificamos o aumento significativo dos níveis de glicose nos moluscos infectados em todos os pontos de análise. Em contrapartida, foi verificado que o piruvato (produto da glicólise) encontrava-se reduzido nos moluscos infectados, indicando a rápida conversão desse ácido pela ação da enzima lactato desidrogenase em lactato. Observamos previamente também, que os ácidos orgânicos indicadores do funcionamento do ciclo de Krebs apresentavam valores significativamente menores em moluscos infectados comparados com os moluscos controle. Esse cenário metabólico nos aponta novamente para a ocorrência da gliconeogênese, porém também indica que o ciclo de Krebs está sendo inibido, dessa forma, esses açúcares presentes na hemolinfa estão sendo aproveitados através da via anaeróbia, confirmada pelo aumento das concentrações de lactato e de atividade de LDH aos 10 d.p.i. e 40 d.p.i.

O consumo dos aminoácidos como substrato energético causa alterações na excreção de produtos nitrogenados, pois os aminoácidos são desmembrados em um esqueleto carbônico, que segue como um α -cetoácido utilizado para a produção de energia e reoxidar o NADH.H^+ , e em um grupo NH_4^+ . A amônia produzida neste processo pode ser destinada à formação de novos aminoácidos, aminas biológicas e nucleotídeos; ou ainda ser desviada para formação de carbamil fosfato e entrar no ciclo da ornitina. Caso o grupamento NH_4^+ seja endereçado para formação de nucleotídeos, esta síntese ocorre pela via das purinas, tendo como um dos seus produtos o ácido úrico. Porém, se o destino for à formação de carbamil fosfato, o grupamento nitrogenado entra no ciclo da ornitina e é excretado na forma de ureia (LIMA, 2016; NELSON; COX, 2011).

Os moluscos terrestres, em função da sua maior dificuldade em manter o seu balanço hídrico, estão expostos à perda excessiva de água e, portanto, à dessecação, buscando mecanismos fisiológicos que evitem a perda excessiva de água. Assim, em condições normais, estes moluscos excretam predominantemente o ácido úrico como produto nitrogenado de excreção/degradação, o qual pode ser eliminado em forma concentrada com pouca perda de água, exibindo um padrão excretor uricotélico. Apesar da eliminação de ácido úrico necessitar

de quantidades menores de água, em comparação à eliminação de ureia, em níveis elevados na hemolinfa, esse componente pode cristalizar, causando danos maiores ao molusco.

A hiperproteinemia decorrente dos danos teciduais, leva, então, a uma sobrecarga de produtos nitrogenados oriundos das reações de desaminação catalisadas pela transaminases, o que faz o molusco ter que excretar este excesso de produtos nitrogenados, a fim de evitar a intoxicação do organismo. Assim, no momento em que a produção de ácido úrico se eleva demasiadamente, elevando sua concentração hemolinfática, se dá a saturação da via e, conseqüentemente, ocorre a estimulação da aceleração da via da ureia. Elevando a produção desta pelo molusco, realizando a detoxificação do organismo (LIMA, 2016).

A requisição de substratos protéicos pelos parasitos em desenvolvimento está relacionada ao seu intenso processo de multiplicação assexuada, no ciclo dos trematódeos, combinados com a alta demanda de proteínas para síntese de membrana celular de suas organelas (PINHEIRO, 2003). Portanto, além da sua utilização como substrato energético para a gliconeogênese, os aminoácidos também podem ser usados na constituição corporal dos parasitos em desenvolvimento. Há também a referência ao consumo direto de L-arginina por larvas de trematódeos durante seu desenvolvimento larval intramolusco (NEGRÃO-CORRÊA et al., 2008).

Esta constatação nos remete diretamente à aceleração do ciclo da ureia observada no presente estudo, que exige a presença de aspartato, o qual reage com a citrulina oriunda da mitocôndria para formar o argininosuccinato que é clivado em fumarato e arginina. Assim, a produção acelerada de arginina, no ciclo da ureia, não apenas explica a elevação do conteúdo de ureia na hemolinfa, mas também a elevação da atividade a AST, a qual catalisa a formação do aspartato, necessário para manutenção do ciclo da ureia, por transaminação do oxaloacetato.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, M. N. de.; MOTA, G. G. Ecologia, reprodução e crescimento da concha de *Leptinaria unilamellata* (D'Orbigny) (Pulmonata, Subulinidae) em condições naturais. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 18, n. 1, p. 23-28, 2011.

BESSA, E. C. de. A.; ARAÚJO, J. L. de. B. Oviposição, tamanho de ovos e medida do comprimento da concha em diferentes fases do desenvolvimento de *Subulina octona* (Breguière) (Pulmonata, Subulinidae) em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 12, n. 3, p. 647-654, 1995.

BRANDOLINI, S. V. P. B.; AMATO, S. B. Desenvolvimento larval de *Paratanaisia bragai* (Santos) (Digenea, Eucotylidae) sob condições experimentais. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 23, n. 4, p. 1097-1100, 2006. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-81752006000400017>.

BRANDOLINI, S. V. P. B.; AMATO, S. B.; PEREIRA, A. A. Relacionamento de *Tanaisia bragai* (Digenea, Eucotylidae) e seu hospedeiro intermediário, *Subulina octona* (Gastropoda, Subulinidae) sob condições experimentais. **Parasitología al día**, v. 21, p. 109-113, 1997. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-07201997000300008>.

BRENDA:EC1.1.1.37. Disponível em: <https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=1.1.1.37#METALS%20and%20IONS> Acesso em 19/04/2020 às 20:37.

CALDEIRA, R. L.; MENDONÇA, C. L. G.; GOVEIA, C. O.; LENZI, H. L.; GRAEFF-TEIXEIRA, C.; LIMA, W. S.; MOTA, E. M.; PECORA, I. L.; MEDEIROS, A. M. Z.; CARVALHO, O. S. First record of molluscs naturally infected with *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) (Nematoda: Metastrongylidae) in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 7, p. 887-889, 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762007000700018>

DICTUS, W. J. A. G.; DE JONG-BRINK, M. de; 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, n. 3, p. 439-450, 1987.

FERREIRA, P.; SOARES, G. L. G.; D'AVILA, S.; BESSA, E. C. A. The influence of caffeine and thymol on the survival, growth and reproduction of *Subulina octona* (Brugüiere, 1789) (Mollusca, Subulinidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 4, p. 945-952, 2009.

FOSSATI, P.; PRENCIPE, L.; BERTI, G. Use of 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic acid /4-aminophenazone chromogenic system in direct enzymic assay of uric acid in serum and urine. **Clinical Chemistry**, vol. 26, p.227-231, 1980.

GELLA, F. J.; OLIVELLA, T.; CRUZ PASTOR, M.; ARENAS, J.; MORENO, R.; DURBAN, R.; GÓMEZ, J. A. A simple procedure for routine determination of aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase with pyridoxal phosphate. **Clinica Chimica Acta**, v.153, p.241-247, 1985.

GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M. Determination of serum proteins by means of the biureto reaction. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 177, p. 751-766, 1949.

GUTMANN, I.; BERGMAYER, H. U. Methods of enzymatic analysis, ed. Bergmeyer, H.U., Academic Press, NY, 1974; 4:1794-1798.

KELLER, G. G.; ARAÚJO, J. L. B. Ciclo evolutivo de *Paratanaisia bragai* (Santos, 1934) (Trematoda, Eucotylidae) como novo hospedeiro intermediário no Brasil: *Leptinaria unilamellata* (D'Orbigny, 1835) (Gastropoda, Pulmonata, Subulinidae) em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 1, n. 2, p. 89 – 92, 1992.

LIMA, M. G. **Angiostrongylus cantonensis (Nematoda): Estudo comparativo dos efeitos da infecção sobre o metabolismo de *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila* (Mollusca)**. 2016. 87p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

NEGRÃO-CORREIA, D. A.; COELHO, P. M. Z.; ANDRADE, Z. A.; MARTINS-SOUZA, R. L.; PEREIRA, C. A. J. “*Biomphalaria* e *Schistosoma mansoni*: papel do sistema interno de defesa do molusco na susceptibilidade ao parasito”. In: ***Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, cap. 15, p. 486-509, 2008.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de bioquímica de Lehninger. Porto Alegre: **Artmed**, 2011. 6. ed.

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. Tese Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2003.

PINHEIRO, J.; GOMES, E. M.; CHAGAS, G. M. Aminotransferases activity in the hemolymph of *Bradybaena similaris* (Gastropoda, Xanthonychidae) under starvation. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 8, p. 1161-1164, 2001.

PINHEIRO, J.; MALDONADO, A. J. R.; LANFREDI, R. M. Physiological changes in *Lymnaea columela* (Say, 1818) (Mollusca, Gastropoda) in response to *Echinostoma paraensei* Lie and basch, 1967 (Trematoda, Echinostomatidae) infection. **Parasitology Research**, v. 106, p. 55-59, 2009. DOI: 10.1007/s00436-009-1630-7

SANTI, M.; ANDRE, M. R.; HOPPE, E. G. L.; WERTHER, K. Occurrence of *Paratanaisia confusa* Freitas, 1951 in free-living guira cuckoo (*Guira guira*, Cuculiformes: Crotophagidae). **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 26, n. 2, p. 248-251, 2017.

SANTI, M.; COUTO, C.; WERTHER, K. Occurrence of *Paratanaisia* spp. Freitas, 1951 in a domiciled cockatiel (*Nymphicus hollandicus*, Psittaciformes: Cacatuidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 27, n. 4, p. 575- 578, 2018. <https://doi.org/10.1590/S1984-296120180034>.

SOCIEDAD ESPAÑOLA DE QUÍMICA CLÍNICA, COMITÉ CIENTÍFICO, COMISIÓN DE ENZIMAS. Método recomendado para la determinación en rutina de la concentración catalítica de la alanina aminotransferasa en suero sanguíneo humano. **Química Clínica**, v.6, p.241-244, 1987.

UNWIN, S.; CHANTREY, J.; CHATTERTON, J.; ALDHOUN, J. A.; LITTLEWOOD, D. T. J. Renal trematode infection due to *Paratanaisia bragai* in zoo housed Columbiformes and a red bird-of-paradise (*Paradisaea rubra*). **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 2, p. 32-41, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2012.11.001>.

XAVIER, V. B. **Morfologia de ovos, larvas e adultos de *Paratanaisia bragai* (Santos, 1934) Freitas, 1959 (Digenea, Eucotylidae) e histopatologia do rim de *Columba livia* (Gm.) infectado**. 2015. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Instituto de Medicina Veterinária, Departamento de Parasitologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, 2015.

CAPÍTULO IV

ALTERAÇÕES NO METABOLISMO DE CÁLCIO E CRESCIMENTO DA CONCHA DO MOLUSCO TERRESTRE *SUBULINA OCTONA* (GASTROPODA, SUBULINIDAE) EXPERIMENTALMENTE INFECTADO POR *PARATANAISIA* *BRAGAI* (DIGENEA, EUCOTYLIDAE)

RESUMO

A presença do mineral cálcio é indispensável para o desenvolvimento dos moluscos, pois além de ser o principal componente da concha desses animais, ele é considerado um importante fator para o metabolismo energético. O objetivo desse estudo foi analisar as alterações nos conteúdos de cálcio na concha e hemolinfa de *Subulina octona* experimentalmente infectada com *Paratanaisia bragai*, relacionando estes parâmetros com o crescimento e o metabolismo energético geral do molusco hospedeiro. Os moluscos infectados foram expostos individualmente por 24 horas a 20 ovos do parasito e quatro grupos contendo moluscos infectados foram formados (10, 20, 30 e 40 d.p.i.), assim como grupos controle. A cada 10 dias, os moluscos eram medidos, a hemolinfa coletada e as conchas removidas eram lavadas e processadas. O conteúdo de cálcio nas conchas dos moluscos infectados com *P. bragai* foi menor do que o observado nos moluscos controle em todos os períodos analisados. No entanto, com excessão aos 30 d.p.i., o conteúdo de cálcio hemolinfático foi maior nos pontos de observação. O padrão oscilante verificado previamente em parâmetros da biologia reprodutiva e metabolismo de carboidratos também foi observado na análise polinomial entre a concentração de cálcio na concha e o tempo de infecção. Além disso, os moluscos infectados apresentaram crescimento menor que o verificado para os moluscos controle. Tais resultados podem refletir as alterações metabólicas originárias do processo de mobilização de carboidratos para obtenção, por via anaeróbia, de energia e uso de precursores não glicídicos para a síntese de glicose e subsequente obtenção de energia. Assim, o cálcio, presente na concha, predominantemente sob a forma de carbonato de cálcio (CaCO_3), é mobilizado para a hemolinfa com a liberação do carbonato e consequente hidratação para levar à formação do tampão bicarbonato e compensar as possíveis alterações decorrentes do aumento da concentração de lactato, que causaria a redução do pH dos líquidos corporais e prejuízos ao funcionamento do metabolismo geral do animal.

Palavras-chave: trematódeo digenético, relação parasito-hospedeiro, metabolismo energético.

ABSTRACT

The presence of the mineral calcium is indispensable for the development of snails, because in addition to being the main component of the shell of these animals, it is considered an important factor for energy metabolism. The aim of this study was to analyze changes in calcium content in the shell and hemolymph of *S. octona* experimentally infected with *P. bragai*, relating these parameters to the growth and general energetic metabolism of the host snail. The infected snails were individually exposed for 24 hours to 20 parasite eggs and four groups containing infected snails were formed (10, 20, 30 and 40 d.p.i.), as well as control groups. Every 10 days, the snails were measured, the hemolymph collected and the shells removed were washed and processed. The calcium content in the shells of snails infected with *P. bragai* was lower than that observed in control snails in all periods analyzed. However, with the exception of 30 a.i., the hemolymphatic calcium content was higher at the observation points. The oscillating pattern previously verified in parameters of reproductive biology and carbohydrate metabolism was also observed in the polynomial analysis between the concentration of calcium in the shell and the time of infection. In addition, the infected snails showed less growth than that observed for the control snails. Such results may reflect the metabolic alterations originating from the carbohydrate mobilization process to obtain energy, anaerobically, and use of non-glycidic precursors for glucose synthesis and subsequent energy acquisition. Thus, calcium, present in the shell, predominantly in the form of calcium carbonate (CaCO_3), is mobilized to the hemolymph with the release of carbonate and consequent hydration to lead to the formation of the bicarbonate buffer and compensate for possible changes resulting from the increase in lactate concentration, which would cause the pH reduction of body fluids and impair the functioning of the animal's general metabolism.

Keywords: digenetic trematode, parasite-host relationship, energy metabolism.

1 INTRODUÇÃO

Historicamente, o íon cálcio ganhou significativo destaque na Fisiologia e Bioquímica, deixando de ser visto apenas como um mineral com função estrutural, na composição de ossos, conchas e outras estruturas em animais. Passando a ser amplamente reconhecido como segundo mensageiro, cofator de diversas enzimas, mediador na transmissão de potencial de ação, componente de solução tampão em processos metabólicos e produção de células de defesa dos moluscos, os hemócitos, além de influenciar na sua capacidade fagocítica (ZELCK et al., 1995; MAGALHÃES et al., 2011).

Nos gastrópodes, a concha composta predominantemente por este mineral está presente em todos os representantes deste grupo. Porém, os artigos publicados pelo grupo chefiado por Marijke de Jong-Brink, principalmente na década de 1980, evidenciaram o papel do cálcio como importante fator para o metabolismo energético, uma vez que o hormônio calfluxina (CaF) secretado pelas células caudodorsais (CDC) do sistema neuro endócrino (NES) nos moluscos, regula o influxo de cálcio nas mitocôndrias, alterando, subsequentemente, a ação catalítica das desidrogenases envolvidas no metabolismo oxidativo mitocondrial (DICTUS et al., 1978; DE JONG-BRINK et al., 1988a; 1988b; DICTUS et al., 1988; SCHALLIG et al., 1991a; 1991b; HORDIJK et al., 1991; 1992).

Quando olhamos para a coevolução que tornou obrigatória a associação das larvas de trematódeos digenéticos com moluscos para que possam realizar, ao menos, o início do seu desenvolvimento larval, a importância deste íon se avoluma de forma significativa.

Ao ingressar no corpo do molusco, seja de forma ativa ou passiva, como no caso de *Paratanaisia bragai* (Santos, 1934), as larvas do trematódeo digenético passam a ter o corpo do molusco como seu único ambiente e nicho ecológico. É deste habitat que as larvas retiram os nutrientes essenciais para a obtenção da energia metabólica para garantir os processos plásticos presentes em seu desenvolvimento intramolusco, como a intensa multiplicação assexuada que ocorre. Ademais, é no organismo deste molusco que as larvas eliminam seus produtos de excreção, assim como, liberam produtos de excreção, estes últimos que podem modular o sistema de defesa interno (IDS) e o NES do molusco hospedeiro, visando garantir

as condições necessárias para seu desenvolvimento chegar a termo (PINHEIRO; AMATO, 1994, BECKER, 1980).

Paratanaisia bragai é um trematódeo digenético de ampla distribuição geográfica, sendo registrado na América do Sul, América Central, Oceania e Ásia (KELLER; ARAÚJO, 1992; KUMAR et al., 2009). No Brasil, parasitos deste gênero têm sido encontrados nos Estados do Paraná (TARODA et al., 2013), Goiás (CARNEIRO et al., 1975), Rio de Janeiro (SANTOS, 1934 *apud* PINTO et al., 2004; MENEZES et al., 2001), São Paulo (SANTI et al., 2018; SANTI et al., 2017; SILVA et al., 2016) e Minas Gerais (TEODORO et al., 2018; TAVELA et al., 2014).

Maldonado (1945a), Keller e Araújo (1992) e Brandolini e Amato (2006) estudaram o ciclo biológico desse parasito indicando os moluscos terrestres *Subulina octona* (Brugüière, 1789) e *Leptinaria unilamellata* (d'Orbigny, 1835) como hospedeiros intermediários no Brasil. São animais hermafroditas, considerados pragas agrícolas e encontrados em locais úmidos e sombreados, como jardins de flores e hortas (ARAÚJO; BESSA, 1993; BOFFI, 1979). Um aspecto importante que destaca a relevância dos estudos sobre *S. octona* é o seu papel como hospedeiro intermediário no ciclo biológico de parasitos de relevância médica e veterinária (DURÇO et al., 2013), como *Platynosomum illiciens* (Braun, 1901), um importante parasito de gatos domésticos (MALDONADO, 1945b); *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) 1905, parasito de cães domésticos e carnívoros silvestres (BESSA et al., 2000) e *A. cantonensis* parasito de ratos (CALDEIRA et al., 2007).

O maior volume de publicações sobre *P. bragai*, trata de registros de aves encontradas naturalmente infectadas em zoológicos, centros de triagem e conservação da vida selvagem. Destas características, depreendemos a elevada importância veterinária deste parasito, pois a atividade de contrabando de aves selvagens acaba por contribuir por dispersar o parasito para diversas regiões geográficas. Além disso, *P. bragai* tem sido registrada infectando aves domésticas ou domesticadas, como papagaios e calopsitas, o que traz à tona o atual conceito relativo à *One Health* onde esforços de diferentes áreas devem atuar em sinergia para a resolução de questões de saúde humana, veterinária e ambiental.

Os artigos pioneiros no estudo da relação de *P. bragai* com seu hospedeiro intermediário molusco são aqueles de Brandolini (BRANDOLINI et al., 1997;

BRANDOLINI; AMATO, 2006). O conhecimento da fisiologia da interação entre molusco e larvas de trematódeos, trazem informações importantes para embasar os programas de controle integrado das doenças parasitárias. Assim, vemos que no sistema *P. bragai*/*S. octona* há uma ausência de informações, fazendo com que o controle desta infecção em aves seja dificultado ou não efetivo.

Assim, o presente estudo teve como objetivo analisar as alterações nos conteúdos de cálcio em concha e hemolinfa de *S. octona* experimentalmente infectada com *P. bragai*, relacionando estes parâmetros com o crescimento e o metabolismo energético geral do molusco hospedeiro.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A obtenção dos moluscos aptos para a infecção e dos ovos do parasito foi realizada como descrito previamente no item 3 Metodologia Geral, encontrada na página 31.

2.1 Coleta e processamento das amostras

Os moluscos foram acompanhados durante 40 dias. A cada 10 dias, foi realizada a medição em milímetros (mm) dos moluscos utilizando um paquímetro universal, com capacidade para 200mm e resolução de 0,05mm (Marca Mitutoyo, modelo 530-114BR) e, posteriormente, a necropsia para a coleta de hemolinfa e da concha.

A hemolinfa foi coletada em banho de gelo através da remoção do ápice da concha, o líquido extravasado foi gotejado diretamente em um microtubo eppendorf com capacidade para 1,5 ml, identificado e armazenado a -20°C até sua utilização. Para a determinação da concentração de cálcio na hemolinfa o analisador automático A15 (Biosystems®) foi utilizado utilizando kits de diagnóstico (Biosystems®), neste 15 µL de amostra foram adicionados a 1mL de reagente de cor (arsenazo III 0,2 mmol/L, imidazol 75 mmol/L). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 650 nm, e a concentração hemolinfática de cálcio foi expressa em mg/dL (MICHAYLOVA; ILLKOVA, 1971).

As conchas foram removidas, lavadas em água destilada, deixadas para secar a temperatura ambiente, pesadas em balança digital analítica (Bel®) e guardadas secas em temperatura ambiente. A determinação de cálcio na concha foi realizada de acordo com as metodologias descritas em 2009 por Soido e colaboradores (As conchas foram colocadas em mufla à 450° C durante 48 horas, posteriormente as cinzas foram pesadas e adicionadas à 50 ml de ácido nítrico concentrado durante 12 horas. Após a abertura das conchas, 1 ml dessa solução foi elevado à 100 ml utilizando água destilada e um balão volumétrico. Em um erlenmeyer, adicionou-se 25 ml da solução de abertura diluída, 40 ml de água destilada, 10 ml de hidróxido de potássio 30% e 0,1g de murexida. Em uma bureta de vidro de 50 mL, foi adicionado 50mL de solução de EDTA 0,1M (Dissolver 37,22 g de Etilenodiaminotetracetato Dissódico Diidratado em um balão de volumétrico de 1000 ml, contendo 500ml de água destilada. Agitar e adicionar água destilada até completar 1000 ml). Titular as amostras com solução de EDTA 0,1M até que a coloração passe de vermelho cereja para lilás e anotar o

volume gasto. Para a obtenção do padrão deve-se pipetar 25 ml de solução padrão de carbonato de cálcio 0,01mol/L para um erlenmeyer e adicionar 40 ml de água destilada, 10 ml de hidróxido de potássio e 0,1 g de murexida e realizar a titulação com EDTA 0,1M onde a coloração passará de vermelho cereja para lilás e anotar o volume de EDTA 0,1M gasto.). A massa de carbonato de cálcio foi calculada e expressa em mg de CaCO_3 /g de cinza.

Nos mesmos intervalos, três moluscos de cada grupo (infectado e controle) foram dissecados e colocados no fixador Duboscq-Brasil (FERNANDES, 1949) durante 48h e depois transferidos para álcool 70% até a realização do processamento. O processamento foi realizado pela técnica histológica de rotina (TOLOSA et al., 2003) no Laboratório de Técnicas Histológicas do Departamento de Biologia Animal da UFRRJ. Cortes seriados com 5 μ m de espessura foram obtidos. O material foi submetido ao procedimento de coloração de von Kossa para a marcação de cálcio. O material foi observado sob o microscópio Olympus BX51®, e as imagens foram capturadas com o software Olympus CellSens Standard (CS-ST-V1, CellSens Standard, v.1.00) ®.

2.2 Análise estatística

Os resultados numéricos da análise de cálcio foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. As médias observadas no grupo infectado foram comparadas com o controle através do teste *t* para dados não pareados ($\alpha=5\%$). *Two-way* ANOVA foi utilizado para verificar as diferenças significativas entre as médias. A relação entre o tempo de infecção e os parâmetros estudados (quantidade de cálcio presente na concha e na hemolinfa e crescimento da concha) foi determinada pela análise de regressão polinomial (InStat, GraphPad, V.4.00, Prisma, GraphPad, v.3.02, Prisma Inc.).

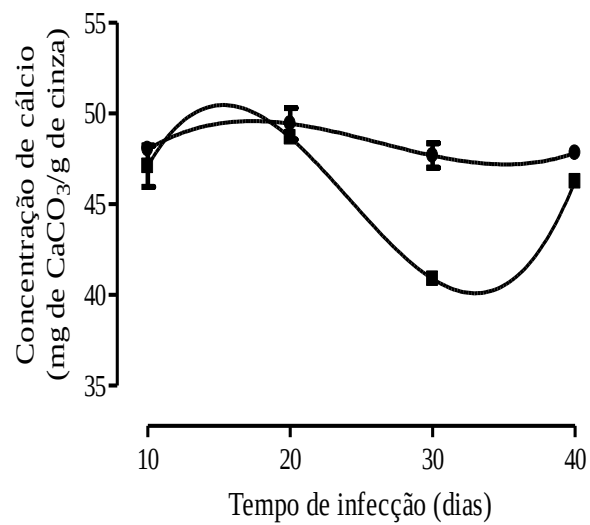
3 RESULTADOS

O conteúdo de cálcio nas conchas não variou de forma significativa dentro dos grupos controle (não infectado) ($P=0,3010$; $r^2=0,33$) e infectado ($P=0,1198$; $r^2=0,52$) ao longo dos 40 dias de observação. Apesar do conteúdo de cálcio nas conchas de *S. octona* infectadas com *P. bragai* ter sido menor do que nos moluscos não infectados em todos os períodos de análise (Tabela 1), quando foi realizada a análise comparativa entre os grupos, a cada período de infecção, utilizando o teste *two-way* ANOVA, ficou evidenciada a existência de diferença significativa apenas entre os moluscos não infectados e infectados aos 30 dias de infecção com *P. bragai* ($P<0,001$).

A análise de regressão polinomial revelou relação significativa ($r^2=0,91$) entre a concentração de cálcio na concha e o tempo de infecção (Figura 1A), havendo o mesmo padrão oscilante observado em parâmetros da biologia reprodutiva e metabolismo de carboidratos no presente estudo.

De forma semelhante ao que foi observado para a concentração de cálcio na concha, na hemolinfa, a análise de regressão polinomial revelou haver apenas relação significativa entre o tempo de infecção e o conteúdo de cálcio na hemolinfa para os moluscos infectados (Figura 1B).

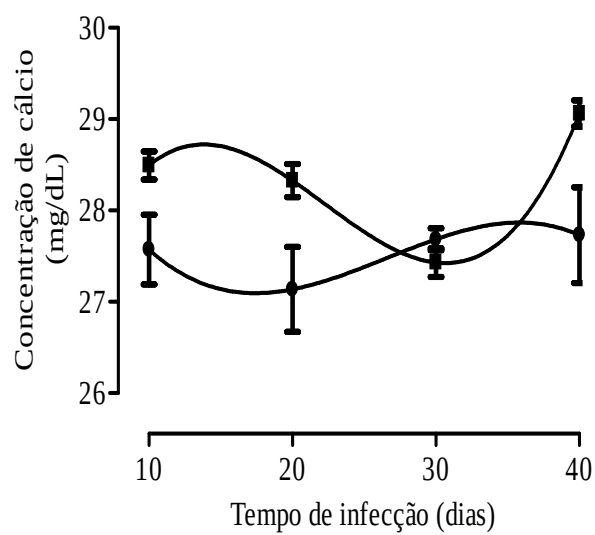
Figura 1: Relação entre o tempo de infecção (em dias) de *Subulina octona* com larvas de *Paratanaisia bragai* e o conteúdo de cálcio A) na concha dos moluscos (mg CaCO_3 /g de cinza); B) na hemolinfa (mg/dL) do molusco hospedeiro.



● Controle
 $y = 38,33 + 1,55x - 0,07x^2 - 0,0008x^3$
 $r^2 = 0,41$

■ Infectado
 $y = 13,65 + 5,69x - 0,27x^2 + 0,0037x^3$
 $r^2 = 0,91$

A



● Controle
 $y = 30,48 - 0,46x + 0,02x^2 - 0,0002x^3$
 $r^2 = 0,34$

■ Infectado
 $y = 24,67 - 0,69x - 0,04x^2 - 0,0005x^3$
 $r^2 = 0,95$

B

O conteúdo de cálcio na hemolinfa dos moluscos não infectados (controle) não variou ao longo dos 40 dias de observação ($P=0,3566$; $r^2=0,29$), o mesmo ocorreu com os moluscos infectados com *P. bragai* ($P=0,6223$; $r^2=0,15$) (Tabela 1). O teste t revelou não haver, em média, diferença significativa entre o conteúdo de cálcio na hemolinfa de moluscos *S. octona* infectados com *P. bragai* e não infectados ($P=0,0790$). Contudo, quando comparamos os valores obtidos aos pares em cada período do desenvolvimento larval intramolusco analisado, através da análise de variância (two-way ANOVA), ficou evidente a diferença significativa na concentração de cálcio na hemolinfa de moluscos não infectados e infectados em quase todos os períodos, com exceção do período de 30 d.p.i.

Tabela 1: Variação no conteúdo de cálcio na concha (expresso como mg de CaCO_3/g de cinza) e na hemolinfa (expresso em mg de Ca^{++}/dL) de *Subulina octona* infectada experimentalmente por *Paratanaisia bragai*, ao longo do período pré-patente de infecção (expresso em dias). Valores expressos em média $\pm$ desvio-padrão ($\bar{x} \pm \text{DP}$)

Tempo de infecção (dias)	Concha (mg de CaCO_3/g de cinza) $\bar{X} \pm \text{DP}$		Hemolinfa (mg/dL) $\bar{X} \pm \text{DP}$	
	Controle	Infectado	Controle	Infectado
10	48,02 $\pm$ 0,55 ^{a*,A**}	47,09 $\pm$ 1,98 ^{a,A}	27,57 $\pm$ 0,38 ^{a,A}	28,49 $\pm$ 0,15 ^{a,B}
20	49,44 $\pm$ 1,51 ^{a,A}	48,67 $\pm$ 0,39 ^{a,A}	27,14 $\pm$ 0,46 ^{a,A}	28,33 $\pm$ 0,18 ^{a,B}
30	47,68 $\pm$ 1,17 ^{a,A}	40,89 $\pm$ 0,40 ^{a,B}	27,68 $\pm$ 0,12 ^{a,A}	27,43 $\pm$ 0,16 ^{a,A}
40	47,83 $\pm$ 0,40 ^{a,A}	46,25 $\pm$ 0,70 ^{a,A}	27,73 $\pm$ 0,52 ^{a,A}	29,06 $\pm$ 0,14 ^{a,B}

* Médias de uma mesma coluna seguidas pelas letras minúsculas iguais, não diferem entre si ao nível de 5% de significância ($P<0,05$).

** Médias de uma mesma linha seguidas pelas letras maiúsculas iguais, não diferem entre si ao nível de 5% de significância ($P<0,05$).

Ao analisarmos a evolução do comprimento da concha dos moluscos ao longo do período de desenvolvimento larval intramolusco, correspondente ao período pré-patente de infecção de *S. octona* com *P. bragai*, observamos que, por amostra de conveniência, moluscos maiores foram utilizados para as infecções experimentais. Contudo, o crescimento percentual, expresso através do comprimento da concha dos moluscos, foi sempre maior nos moluscos não infectados (Tabela 2), sendo 1,28% maior do que o crescimento percentual do comprimento da concha de *S. octona* infectada com *P. bragai*. Apesar desta variação, a diferença observada, não foi significativa ($P=0,3696$; $r^2=0,10$).

Quando analisamos de forma comparativa o comprimento da concha dos pares, moluscos controle (não infectado) e infectado, em cada período (*two-way*ANOVA), observamos que apenas aos 30 dias de infecção não há diferença significativa entre o comprimento médio da concha dos moluscos controle e infectado ($P>0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2: Variações no comprimento de concha (expresso em cm) de *Subulina octona* ao longo do desenvolvimento larval intramolusco de *Paratanaisia bragai* em infecção experimental. Média $\pm$ desvio-padrão = $X \pm DP$.

Tempo de infecção (dias)	Comprimento de concha (cm)				Diferença percentual entre infectados e controle (%)
	Controle $X \pm DP$	Aumento percentual (%)	Infectados $X \pm DP$	Aumento percentual (%)	
0	1,19 $\pm$ 0,1308 ^{a*,A**}	-	1,25 $\pm$ 0,1148 ^{a,B}	-	5,04
10	1,29 $\pm$ 0,1285 ^{a,A}	8,40	1,35 $\pm$ 0,1196 ^{a,B}	8,00	4,65
20	1,34 $\pm$ 0,1296 ^{a,A}	12,60	1,40 $\pm$ 0,1279 ^{a,B}	12,00	4,48
30	1,40 $\pm$ 0,1274 ^{a, A}	17,65	1,45 $\pm$ 0,1213 ^{a,A}	16,00	3,57
40	1,41 $\pm$ 0,1275 ^{a,A}	18,49	1,45 $\pm$ 0,1176 ^{a,B}	16,00	2,84
Média	1,3262	14,28	1,3790	13,00	3,98

* Médias de uma mesma coluna seguidas pelas letras minúsculas iguais, não diferem entre si ao nível de 5% de significância ($P<0,05$).

** Médias de uma mesma linha seguidas pelas letras maiúsculas iguais, não diferem entre si ao nível de 5% de significância ($P<0,05$).

A análise de regressão polinomial revelou uma fraca relação entre o tempo de infecção e o crescimento do comprimento da concha de moluscos infectados com *P. bragai* (Figura 2). Embora o tamanho dos moluscos infectados sempre se manteve acima daquele observado para os moluscos não infectados, é preciso atentar para o fato de termos iniciado a infecção dos moluscos com espécimes maiores do que aqueles que foram tomados como grupo controle.

Ao contrário da percepção inicial, os moluscos infectados apresentaram crescimento menor do que o que foi verificado para os moluscos não infectados (controle). Quando comparamos a variação percentual dos moluscos de ambos os grupos no período 0 (zero), antes da infecção, os moluscos infectados são 5% maiores do que os do grupo controle, ao longo do período pré-patente estudado esta variação percentual vai sendo reduzida (Tab. 2).

A análise histoquímica pela técnica de von Kossa revelou intensa deposição de cálcio nos tecidos da glândula digestiva (Figura 3). Nos moluscos controle verifica-se a presença de grandes quantidades de cálcio, o tecido conjuntivo frouxo e a estrutura acinar mostraram-se preservados, nos ácinos verifica-se a presença de material amorfo em seu interior (Figura 1A). As imagens obtidas de moluscos infectados por *P. bragai* evidenciaram a presença de larvas do parasito, danos à estrutura dos ácinos característicos da glândula digestiva e intensa vacuolização. No entanto, apesar dos danos teciduais observados, é possível verificar a presença de cálcio de maneira difusa no tecido, e, também, no interior dos estágios larvais (Figura 1B, 1C e 1D).

Figura 2: Relação entre o tempo de infecção com *Paratanaisia bragai* e o crescimento da concha de *Subulina octona*, expresso como comprimento de concha (em cm).

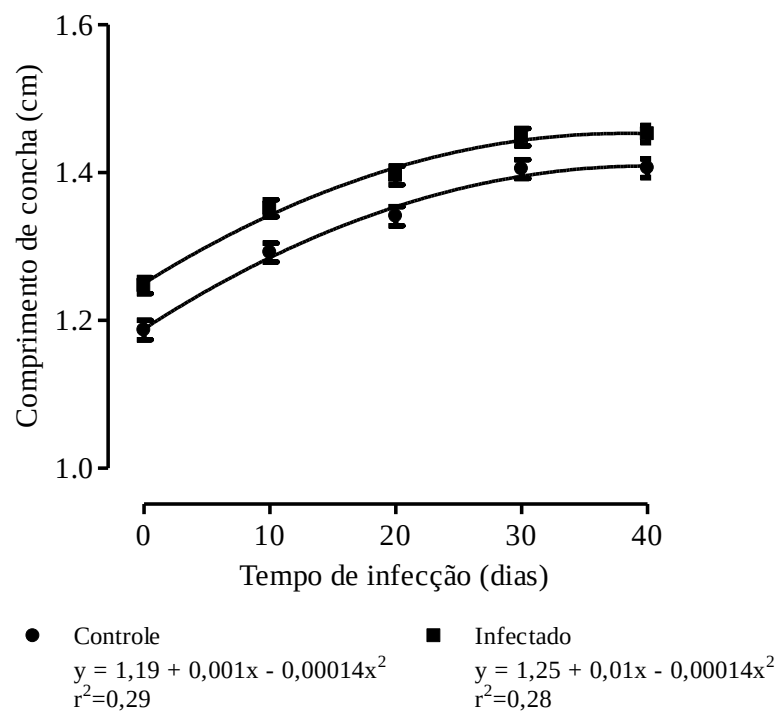
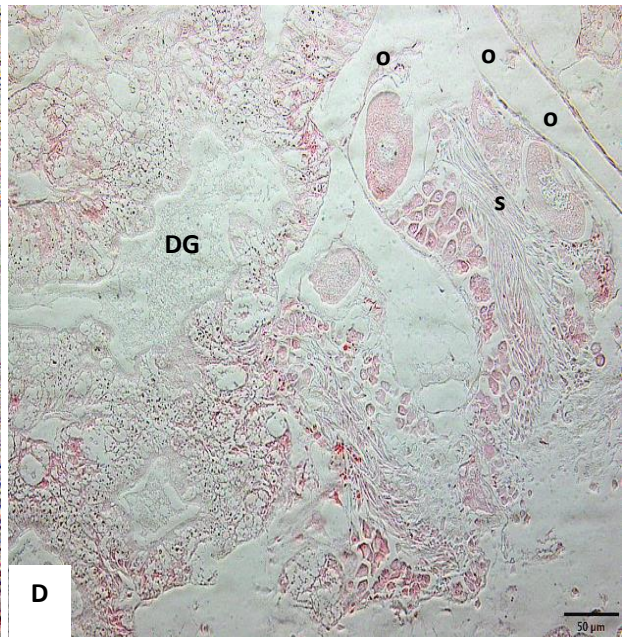
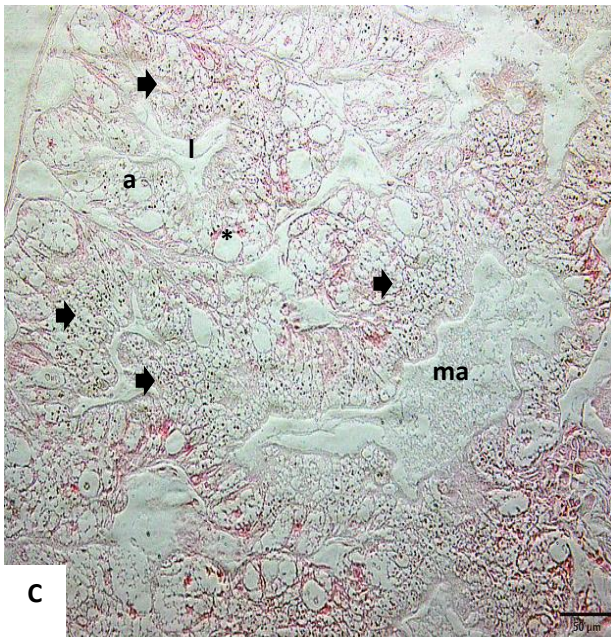
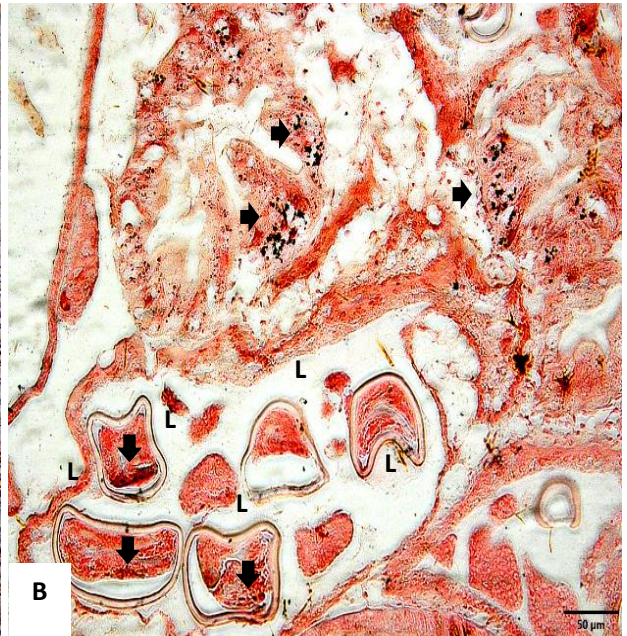
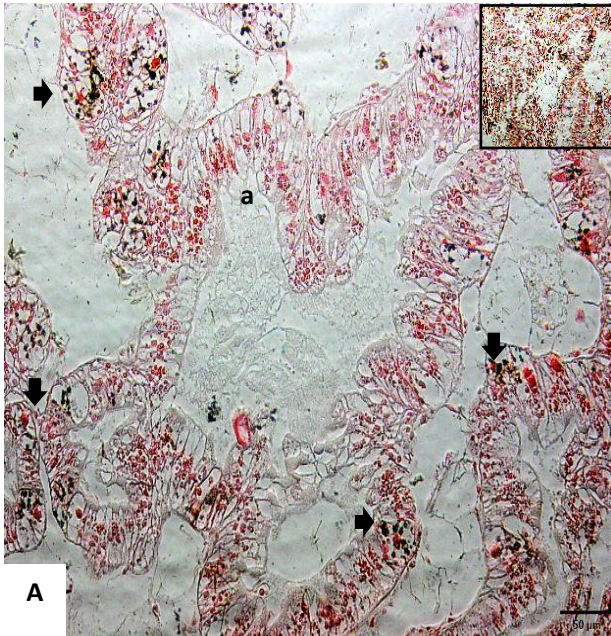


Figura 3: Histoquímica para cálcio em tecidos de *Subulina octona* experimentalmente infectada com *Paratanisia bragai*. **A)** Secção de glândula digestiva de molusco não infectado (controle), com marcação intensa (setas) evidenciando a presença de grande quantidade de cálcio neste tecido; a – região acinar. Barra da escala = 50µm. **B)** Região da glândula digestiva de molusco infectado aos 30 d.p.i., com intensa presença de cálcio nos tecidos do hospedeiro (setas) e nas larvas do parasito em desenvolvimento (L), com intensa desorganização da estrutura acinar. Barra da escala = 50µm. **C)** Região da glândula digestiva de molusco infectado aos 30 d.p.i. com aumento significativo da quantidade de cálcio nos tecidos de forma difusa (setas), evidenciando o lúmen tubular (l), vacuolização (*), desorganização da estrutura acinar e aumento da quantidade de material amorfo intra acinar (ma). Barra da escala = 50µm. **D)** Corte de parte da glândula digestiva (DG) e de ovotestis de molusco infectado aos 30 d.p.i., neste último observamos gametas femininos (o) e masculinos (s) em desenvolvimento, porém sem a presença de depósitos de cálcio na região da gônada. Barra da escala = 50µm. Coloração: von Kossa. Observações feitas em campo claro (A e B) e DIC (C e D).



4 DISCUSSÃO

Analisando de forma global os resultados obtidos neste estudo, observamos que o conteúdo de cálcio nas conchas dos moluscos infectados manteve-se abaixo dos valores obtidos para os moluscos não infectados, o que leva os hospedeiros à crescerem menos, sendo evidenciado pela redução progressiva do percentual deste parâmetro ao longo do período pré-patente analisado.

Brandolini e colaboradores (1997) observaram que o parasitismo por *P. bragai* exerce influência sobre o crescimento de *S. octona*. Estes autores constataram que entre a 1ª e 5ª semanas de infecção, os moluscos infectados exibiram crescimento maior do que aquele dos moluscos do grupo controle. Contudo, esta diferença foi mais pronunciada na 4ª semana de infecção. Ainda, foi observado que a partir da 6ª semana, quando as larvas alcançaram o estágio de metacercária, o crescimento dos moluscos infectados com *P. bragai* foi inferior ao dos não infectados, com a progressão desta redução de crescimento até o final do período de observação utilizado por estes autores (10ª semana de infecção). No presente estudo, de forma oposta, os moluscos infectados tiveram uma taxa de crescimento menor do que os moluscos não infectados, tal divergência pode estar associada ao número de ovos de *P. bragai* utilizados para a infecção experimental, o que resultou em cargas parasitárias diferentes, uma vez que assumimos que Brandolini e Amato (2006) em um outro artigo utilizaram cinco ovos do trematódeo para as infecções experimentais, e, no presente estudo foram utilizados vinte ovos, elevando a carga parasitária e, conseqüentemente, os efeitos do desenvolvimento larval intramolusco sobre o metabolismo do molusco hospedeiro.

Simultaneamente às alterações no conteúdo de cálcio na concha, observou-se que a calcemia foi, em média, maior nos moluscos infectados (28,33mg/dL) em comparação aos animais não infectados (27,53mg/dL), sendo inferior aos valores obtidos para os animais controle apenas aos 30 dias de infecção.

Tunholi e colaboradores (2011) observaram que em *B. glabrata* infectada com diferentes cargas miracidiais de *E. paraensei* o conteúdo de cálcio na concha é maior do que nos moluscos não infectados nas duas primeiras semanas de infecção, sendo significativamente reduzido nas duas semanas subsequentes. Enquanto que na hemolinfa o

comportamento foi oposto, com redução inicial e elevação final da calcemia. No presente estudo, o metabolismo de cálcio seguiu um padrão semelhante ao observado por Tunholi e colaboradores (2011) nas duas primeiras semanas de infecção, sendo reduzido na concha e elevado na hemolinfa, o que nos permite inferir que as alterações decorrentes no metabolismo de *S. octona* em decorrência da infecção por *P. bragai* são mais severas do que aquelas observadas em *B. glabrata* infectada com *E. paraensei*, mobilizando as reservas de cálcio da concha para a hemolinfa, elevando a capacidade tamponante deste meio fisiológico.

Tais resultados podem refletir as alterações metabólicas que surgem no processo de mobilização de carboidratos para obtenção, por via anaeróbia, de energia e outros precursores não glicídicos para a síntese de glicose e subsequente obtenção de energia. Estes processos metabólicos elevam de forma significativa a concentração de ácidos orgânicos, tal como foi evidenciado com o conteúdo de ácido láctico na hemolinfa de moluscos infectados, determinado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em capítulo anterior do presente estudo. Assim, o cálcio, presente na concha, predominantemente sob a forma de carbonato de cálcio (CaCO_3), é mobilizado para a hemolinfa com a liberação do carbonato e consequente hidratação para levar à formação do tampão bicarbonato e compensar as possíveis alterações decorrentes do aumento da concentração de lactato que causariam a redução do pH dos líquidos corporais e prejuízos ao funcionamento do metabolismo geral do animal, como, por exemplo, pela alteração ou inativação de enzimas.

Geralmente, a infecção por larvas de trematódeos leva à depleção de estoques de carboidratos dos hospedeiros intermediários, uma vez que estes substratos são a base do metabolismo energéticos de moluscos (JOOSSE; VAN ELK, 1986). Contudo, em capítulo anterior, ficou evidenciado que a infecção com *P. bragai* tem poucos reflexos sobre os depósitos de carboidratos, havendo principalmente a elevação da glicemia de *S. octona*, em decorrência desta infecção.

Nos moluscos *S. octona*, a infecção por *P. bragai* levou a uma significativa hiperproteinemia, relacionada à lesões celulares, caracterizadas pela elevação da atividade da ALT. Assim, o molusco necessita metabolizar o excedente de proteínas hemolinfáticas, levando à elevação de produtos nitrogenados de excreção, como ureia e ácido úrico, provocando mudanças no pH do meio. Esta degradação dos substratos proteicos, leva a um

balanço negativo em função do alto consumo de nutrientes pelas larvas em desenvolvimento e levando a um aumento na produção de ácidos orgânicos, seguido da redução do pH hemolinfático (PINHEIRO; AMATO, 1994).

Tal processo dispara a mobilização do CaCO_3 da concha para que o carbonato possa compor o tampão bicarbonato e levar à correção do pH para que este não varie além dos limites fisiológicos (DE WITT; SMINIA, 1980; PINHEIRO; AMATO, 1994).

A análise histoquímica mostra a presença de cálcio distribuído de forma dispersa na glândula digestiva dos moluscos infectados. Esse resultado corrobora com os demais encontrados no presente estudo, pois o cálcio presente no molusco está sendo mobilizado para formação do tampão bicarbonato. Além disso, como foi relatado em capítulo anterior, a presença do parasito causa danos teciduais intensos no molusco hospedeiro.

Concluindo, observamos que os efeitos da infecção de *S. octona* com *P. bragai* são bastante divergentes do que temos encontrado na literatura quanto à sua sequência de eventos, com reduzida mobilização de carboidratos e elevada metabolização de proteínas. Neste caso, não devido a um balanço energético negativo decorrente da elevação da demanda energética pelas larvas em desenvolvimento, mas como consequência das lesões teciduais provocadas pelo desenvolvimento larval intramolusco, levando à hiperproteinemia. Assim, o molusco lança mão de processos homeostáticos, visando retomar o equilíbrio ácido-básico do meio interno.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, J. L. B.; BESSA, E. C. A. Moluscos de importância econômica no Brasil. II. Subulinidae, *Subulina octona* (Bruguière) (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata, Stylommatophora). **Revista Brasileira de Zooogia**, v. 10, p. 489-497, 1993. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-81751993000300016>.
- BECKER, W. Metabolic interrelationship of parasite trematodes and molluscs, especially *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*. **Zeitschrift for Parasitenkunde**, v. 63, p. 101-111, 1980.
- BESSA, E. C. A.; LIMA, W. S.; CURY, M. C.; ARAÚJO, J. L. B. Desenvolvimento biológico de *Angiostrongylus vasorum* (Baillet) Kamensnky (Nematoda, Angiostrongylidae) em *Subulina octona* Bruguière (Mollusca, Subulinidae) em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 17, n. 1, p. 29-41, 2000.
- BOFFI, A. V. **Moluscos brasileiros de interesse médico e econômico**. São Paulo: Hucitec, 1979.
- BRANDOLINI, S. V. P. B.; AMATO, S. B. Desenvolvimento larval de *Paratanaisia bragai* (Santos) (Digenea, Eucotylidae) sob condições experimentais. **Revista Brasileira de Zoologia**, vol. 23, n. 4, p. 1097-1100, 2006.
- BRANDOLINI, S. V.; AMATO, S. B.; PEREIRA, A. A. Relacionamento de *Tanaisia bragai* (Digenea, Eucotylidae) e seu hospedeiro intermediário, *Subulina octona* (Gastropoda, Subulinidae) sob condições experimentais. **Parasitologia al día**, v. 21, n. 3-4, p. 109-113, 1997.
- CALDEIRA, R. L.; MENDONÇA, C. L. G.; GOVEIA, C. O.; LENZI, H. L.; GRAEFF-TEIXEIRA, C.; LIMA, W. S.; MOTA, E. M.; PECORA, I. L.; MEDEIROS, A. M. Z.; CARVALHO, O. S. First record of molluscs naturally infected with *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) (Nematoda: Metastrongylidae) in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 7, p. 887-889, 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762007000700018>
- CARNEIRO, J. R.; LUSTOSA, E. S.; PEREIRA, E.; CARVALHO, E. D.; NÁPOLI, M. A. Incidência de ecto e endeoparasitos de pombos (*Columbia livia domestica*) em Goiânia. **Revista de Patologia Tropical**, v. 4, n. 1, p. 39-41. 1975.
- DE JONG-BRINK, M.; ELSAADANY, M. M.; BOER, H. H. Schistosomin, an antagonist of calflugin. **Experimental Parasitology**, v. 65, n. 1, p. 109-118, 1988b.

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, n. 1, p. 91-100, 1988a.

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.

DICTUS, W. J. A. G.; BROERS-VENTRIG, C. M.; DE JONG-BRINK, M. The role of IP₃, PKC, and pHi in the stimulus-response coupling of calfluxin-stimulated albumen glands of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 70, n. 2, p. 206-215, 1988.

DICTUS, W. J. A. G.; DE JONG-BRINK, M. de; 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, n. 3, p. 439-450, 1978.

DURÇO, E.; MATOS, F.; PILATE, V.; CORTEZ, L.; BESSA, E. A.; SILVA, L. Estudo comportamental comparado entre *Subulina octona* (Brugüière, 1789) e *Leptinaria unilamellata* (d'Orbigny, 1835) (Mollusca: Subulinidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 15, n. 1,2,3, p. 97 – 105, 2013.

FERNANDES, M. C. **Métodos escolhidos de técnicas microscópicas**. 2ed. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1949.

HORDIJK, P. L.; DE JONG-BRINK, M.; TER MAAT, A.; PIENEMAN, A. W.; LODDER, J. C.; KITS, K. S. The neuropeptide schistosomin and haemolymph from parasitized snails induce similar changes in excitability in neuroendocrine cells controlling reproduction and growth in a freshwater snail. **Neuroscience letters**, v. 136, n. 2, p. 193-197, 1992.

HORDIJK, P. L.; LOENHOUT, H.; EBBERINK, R. H. M.; DE JONG-BRINK, M.; JOOSSE, J. Neuropeptide schistosomin inhibits hormonally-induced ovulation in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. **Journal of Experimental Zoology**, v. 259, n. 2, p. 268-271, 1991.

JOOSSE, J.; VAN ELK, R. *Trichobilharzia ocellata*: physiological characterization of giant growth, glycogen depletion, and absence of reproductive activity in the intermediate snail host, *Lymnaea stagnalis*. **Experimental parasitology**, v. 62, n. 1, p. 1-13, 1986.

KELLER, G. G.; ARAÚJO, J. L. B. Ciclo evolutivo de *Paratanaisia bragai* (Santos, 1934) (Trematoda, Eucotylidae) como novo hospedeiro intermediário no Brasil: *Leptinaria unilamellata* (D'Orbigny, 1835) (Gastropoda, Pulmonata, Subulinidae) em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 1, n. 2, p. 89 – 92, 1992.

- KUMAR, B. M.; TAIBUR, R.; SUSHANTA, G.; SAIDUL, I. On the incidence and pathology of *Paratanaisia bragai* dos Santos, 1934 (Freitas, 1959) infection in domestic pigeon (*Columba livia*). **Journal of Veterinary Parasitology**, v. 23, n. 2, p. 159-161, 2009.
- MAGALHÃES, A. C.; PINHEIRO, J.; MELLO-SILVA, C. C. A mobilização do cálcio em *Biomphalaria glabrata* exposta a diferentes quantidades de carbonato de cálcio. **Revista de Patologia Tropical**, v. 40, n. 1, p. 46-55, 2011.
- MALDONADO, J. F. Ciclo vital e biologia del *Platynosomum fastosum* Kossak, 1910 (Trematoda: Dicrocoelidae). **The Puerto Rico Journal of Public Health and Tropical Medicine**, v. 21, n. 1, p. 40-60. 1945b.
- MALDONADO, J. F. The life cycle of *Tamerlania bragai*, Santos, 1934 (Eucotylidae), a kidney fluke of domestic pigeons. **Journal of Parasitology**, v. 31, n. 5, p. 306 – 314, 1945a. <http://dx.doi.org/10.2307/3273085>.
- MENEZES, R. C.; MATTOS JR. D. G.; TORTELLY, R.; MUNIZ-PEREIRA, L. C.; PINTO, R. M.; GOMES, D. C. Trematodes of free range reared guinea fowls (*Numida meleagris* Linnaeus, 1758) in state os Rio de Janeiro, Brazil: morfology and pathology. **Avian Pathology**, v. 30, p. 209-214, 2001.
- MICHAYLOVA, V.; ILLKOVA, P. Photometric determination of micro amounts of calcium with Arsenazo III. **Anal Chim Acta**, vol. 53, p.194-198, 1971.
- 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, n. 3, p. 407-410, 1994.
- PINTO, R. M.; MENEZES, R. C.; TORTELLY, R. Systematic and pathology study of *Paratanaisia bragai* (Santos, 1934) Freitas, 1959 (Digenea, Eucotylidae) infestation in ruddy ground dove *Columbina talpacoti* (Temminck, 1811). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n.4, p. 472-479, 2004.
- SANTI, M.; ANDRE, M. R.; HOPPE, E. G. L.; WERTHER, K. Occurrence of *Paratanaisia confusa* Freitas, 1951 in free-living guira cuckoo (*Guira guira*, Cuculiformes: Crotophagidae). **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 26, n. 2, p. 248-251, 2017.
- SANTI, M.; COUTO, C.; WERTHER, K. Occurrence of *Paratanaisia* spp. Freitas, 1951 in a domiciled cockatiel (*Nymphicus hollandicus*, Psittaciformes: Cacatuidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 27, n. 4, p. 575- 578, 2018. <https://doi.org/10.1590/S1984-296120180034>.

SCHALLIG, H. D. F. H.; HORDIJK, P. L.; OOSTHOEK, P. W.; DE JONG-BRINK, M. Schistosomin, a peptide present in the haemolymph of *Lymnaea stagnalis* infected with *Trichobilharzia ocellata*, is produced only in the snail's central nervous system. **Parasitology Research**, v. 77, n. 2, p. 152-156, 1991a.

SCHALLIG, H. D. F. H.; SASSEN, M. J. M.; HORDIJK, P. L.; DE JONG-BRINK, M. *Trichobilharzia ocellata*: influence of infection on the fecundity of its intermediate snail host *Lymnaea stagnalis* and cercarial induction of the release of schistosomin, a snail neuropeptide antagonizing female gonadotropic hormones. **Parasitology**, v. 102, n. 1, p. 85-91, 1991b.

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.

SILVA, T. M.; PAVAN, L. F.; GUIMARÃES-OKAMOTO, P. T. C.; MILBRADT, E. L.; ANDREATTI FILHO, R. L.; SILVA, R. J.; OKAMOTO, A.S. First record of *Paratanaisia bragai* (Digenea: Eucotylidae) in blue and gold macaw (*Ara ararauna*). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, n. 1, p. 112-115, 2016. <https://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612016001>.

TARODA, A.; BARROS, L. D.; ZULPO, D. L.; CUNHA, I. A. L.; PAIVA, M. C. D. C.; SAMMI, A. S.; SANTOS, J. R.; YAMAMURA, M. H.; VIDOTTO, O.; GARCIA, J. L. Occurrence of gastrointestinal and renal helminths in *Zenaida auriculata* (Des Murs, 1847) trap-captured from Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 3, p. 415-419, 2013. <https://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612013000300016>.

TAVELA, A. O.; CARRETTA JUNIOR, M.; OLIVEIRA, A. R.; CARNEIRO, F. T.; SILVA, V. H. D.; BRAGA, F. R.; PEIXOTO, J. V.; CARVALHO, G. D.; ARAÚJO, J. V.; PAULA, T. A. R. Parasitism by *Paratanaisia bragai* (Digenea, Eucotylidae) in common waxbill (*Estrilda astrild*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 4, p. 1276-1280, 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-7136>

TEODORO, T. G. W.; OLIVEIRA JUNIOR, I. M.; LIMA, H. C.; REIS, M. O.; MIRANDA, J. L.; FAVORETTO, S. M.; PINTO, H. A.; LACRETA JÚNIOR, A. C. C.; WOUTERS, A. T. B.; VARASCHIN, M. S. *Psittacara leucophthalmus* (Aves: Psittacidae) como um novo hospedeiro de *Paratanaisia bragai* (Trematoda: Eucotylidae) no Brasil: achados clínicos e patológicos: relato de caso. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, n. 5, p. 1569 – 1576, 2018. <https://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-10300>.

TOLOSA, E. M. C.; RODRIGUES, C. J.; BEHMER, O. A.; FREITAS-NETO, A. G. **Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica**, 2 ed. São Paulo: Manole, 2003.

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

Influence of *Echinostoma paraensei* (Lie and Basch, 1967) infection on the calcium content in *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Experimental parasitology**, v. 129, n. 3, p. 266-269, 2011.

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

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Analisando o conjunto de resultados obtidos no presente estudo, podemos melhor definir as alterações reprodutivas e metabólicas em *Subulina octona* quando infectada, sob condições experimentais, pelo digenético *Paratanaisia bragai*.

Em relação aos aspectos reprodutivos, a quantidade semelhante de galactogênio e a ausência de larvas em desenvolvimento nos tecidos gonadais indicam a existência de um processo de castração parasitária causada por mecanismos indiretos endócrinos, levando à inibição da maturação dos oócitos, provavelmente devido à presença de produtos de excreção e secreção (E/S) liberados pelas larvas durante o seu desenvolvimento intramolusco. Dessa forma, os resultados obtidos nos parâmetros analisados indicam que a castração, não é do tipo nutricional e nem direta, ocorrendo de forma indireta pela modulação do sistema neuro-endócrino do hospedeiro pelo parasito, afetando o funcionamento das regiões secretoras das células caudo dorsais e corpo dorsal.

O mapa metabólico, presente na página X, foi reformulado de tal forma que fosse possível observar os achados desse estudo. Na figura, representamos em verde todos os parâmetros nos quais as médias globais se mostraram aumentadas e em vermelho todos aqueles em que as médias se apresentaram diminuídas nos moluscos infectados em comparação com o controle.

Nesse esquema, podemos ver a inibição do ciclo de Krebs, ou seja, a desaceleração do metabolismo aeróbio, indicada pela diminuição do conteúdo de piruvato, oxalato e succinato. Porém, o metabolismo anaeróbio é aumentado, como pode-se observar com o aumento da atividade da lactato desidrogenase e aumento do conteúdo de lactato. Esses resultados indicam a ocorrência de um desvio metabólico onde a atividade do metabolismo oxidativo mitocondrial é reduzida e ocorre o aumento da atividade fermentativa no sentido de degradar o piruvato para formação de lactato, com garantia de produção rápida, apesar de menos rentável, de energia e de reoxidação dos aceptores de elétrons (NAD^+).

A diminuição no conteúdo de ácidos orgânicos pode ser entendida como uma resposta fisiológica na tentativa de equilibrar o pH. Além disso, a redução nos níveis de ácido oxálico pode indicar que esse composto está sendo utilizado como um substrato necessário para o

desenvolvimento de esporocistos e cercárias. Já a diminuição no conteúdo de ácido succínico também é importante pela metabolização do succinato em propionato, gerando energia e auxiliando na manutenção do balanço redox.

Podemos verificar também que a concentração de glicogênio, mantém-se elevada nos moluscos infectados, indicando que esse polissacarídeo de reserva não está sendo mobilizado, mas sim, sintetizado a partir dos elevados níveis de glicose presentes na hemolinfa. Essa glicose pode ser oriunda de duas fontes distintas, são elas: o uso de substratos não glicídicos para a produção de energia e o fornecimento de alimentação *ad libitum*, ou seja, oferta de alimentos acima do necessário para a sobrevivência dos moluscos.

No presente estudo, as proteínas foram indicadas como o substrato proteico utilizado na gliconeogênese para a síntese *de novo* de glicose e manutenção do balanço redox. O aumento da atividade das aminotransferases, sobretudo a ALT, indicam a existência de danos teciduais, sugerindo uma atividade histolítica indireta das formas larvais de *P. braqai*, extravazando grandes quantidades de proteínas constituintes dos tecidos danificados para a hemolinfa. Porém, a hiperproteinemia é uma condição desfavorável ao metabolismo do molusco, sendo necessária a utilização dessas moléculas. Na tentativa de aproveitar esse material e diminuir a hiperproteinemia, o molusco utiliza-o na gliconeogênese, onde haverá a produção de intermediários glicídicos. Adicionalmente, os aminoácidos podem ser usados na constituição corporal dos parasitos em desenvolvimento.

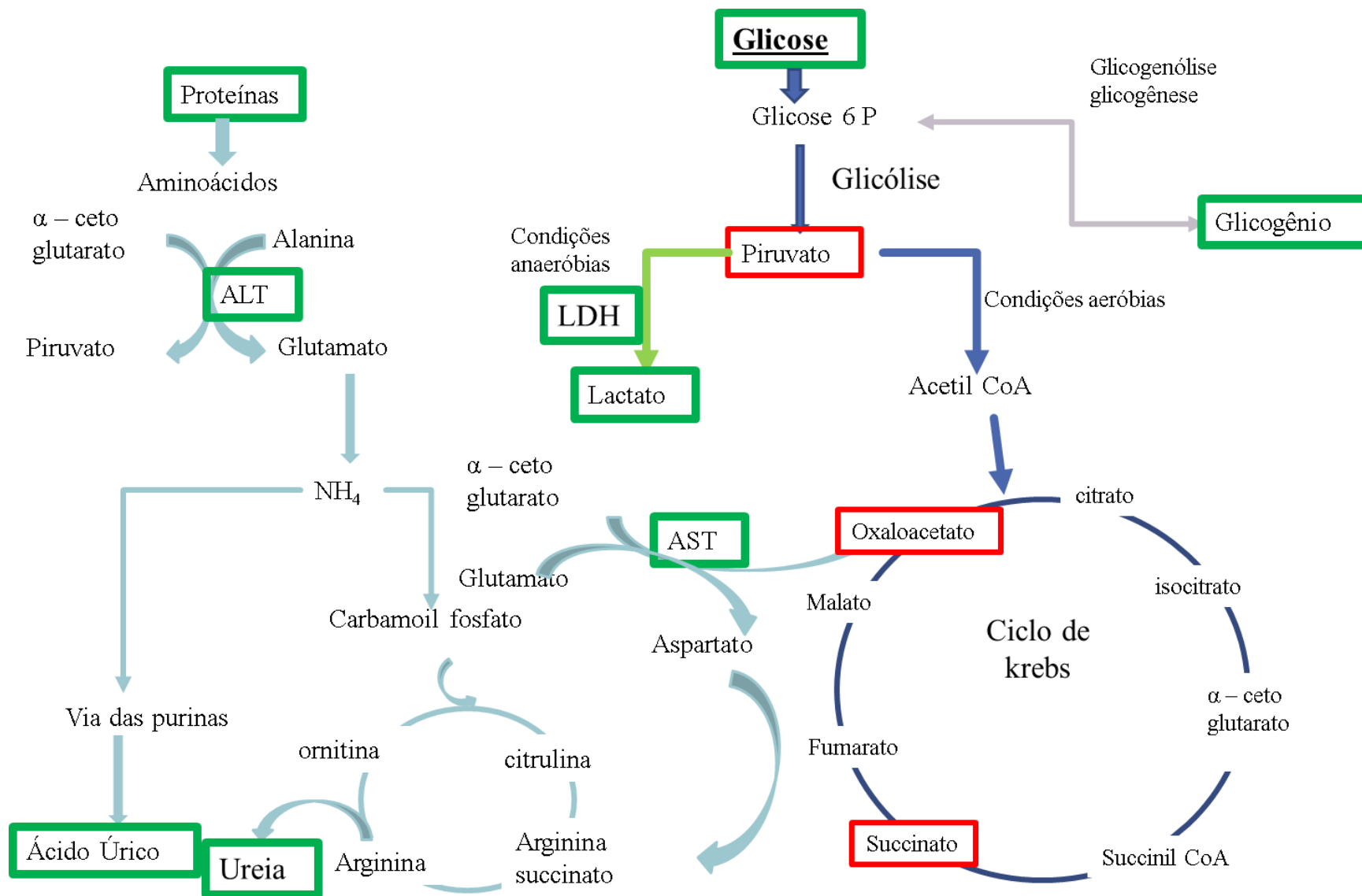
O uso de aminoácidos como substrato energético é responsável pelo aumento da concentração dos produtos nitrogenados de excreção. Apesar dos moluscos terrestres possuírem o padrão de excreção uricotélico, onde a perda de água é significativamente reduzida, quando a via das purinas encontra-se saturada e há riscos do ácido úrico sofrer cristalização, é necessária a intensificação da detoxificação através da eliminação de ureia, apesar da perda de água que esse processo possa causar. No entanto, a produção de ureia através do ciclo da ornitina, leva a produção de arginina, um metabólito que é usado pelas larvas de trematódeos durante seu desenvolvimento larval intramolusco.

Além de indicar danos teciduais, o aumento da atividade de AST está ligado à vários processos metabólicos realizados pelo molusco. Observando o metabolismo de produtos nitrogenados, atribui-se a AST a formação de aspartato necessário para a realização do ciclo

da úreia por transaminação do oxaloacetato, o que leva à produção de arginina. Além disso, o aumento da atividade de AST pode estar associada a aceleração da lançadeira via malato, a qual está acoplada à reação catalisada pela enzima malato desidrogenase, que requer o íon Ca^{+2} como ativador, cujo objetivo é reoxidar o NAD^{+} . Dessa forma, essa enzima assume papel importante nas alterações metabólicas em *S. octona* infectada por *P. bragai*.

Em relação ao metabolismo de cálcio, fica evidenciado, no presente estudo, que o cálcio, presente na concha, predominantemente sob a forma de carbonato de cálcio (CaCO_3), é mobilizado para a hemolinfa para formação do tampão bicarbonato na tentativa de compensar as possíveis alterações decorrentes do aumento da concentração de ácidos orgânicos que causariam a redução do pH dos líquidos corporais e prejuízos ao funcionamento do metabolismo geral do animal, como, por exemplo, pela alteração ou inativação de enzimas.

Figura 1: Mapa metabólico de *Subulina octona* experimentalmente infectada por *Paratanaisia bragai* durante 40 dias pós infecção com a indicação dos parâmetros analisados no presente estudo. Em verde estão em destaque os parâmetros que apresentaram médias globais aumentadas e em vermelho os que apresentaram diminuição. Fonte: Autora.



CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, é possível concluir que a infecção de *Subulina octona* por *Paratanaisia bragai* teve as seguintes consequências:

- A atividade reprodutiva dos moluscos infectados foi alterada, sugerindo um processo de castração parasitária indireta, que indicam a presença de produtos endócrinos que reduziram a gametogênese feminina e a viabilidade dos embriões.
- A determinação das concentrações hemolinfáticas de glicose, e dos ácidos carboxílicos, succínico, oxálico, láctico e pirúvico; assim como a atividade da enzima lactato desidrogenase, evidenciaram a transição do metabolismo energético, preferencialmente, aeróbio para anaeróbio ao longo do período pré patente da infecção.
- A lesão tecidual causou elevação na concentração das proteínas totais presentes na hemolinfa e intensa atividade das aminotransferases, AST e ALT.
- A sobrecarga de produtos nitrogenados na hemolinfa, levou a um processo de detoxificação, provocando a alteração do padrão excretor de uricotélico para ureotélico.
- O carbonato de cálcio, presente na concha, foi possivelmente mobilizado para formação do tampão bicarbonato, buscando compensar as possíveis alterações do pH dos líquidos corporais e prejuízos ao funcionamento do metabolismo geral do molusco.
- Entre os períodos analisados, verificamos alterações mais evidentes aos 40 d.p.i., momento no ciclo biológico em que ocorre o encistamento do parasito para formar o estágio de metacercária.

O estudo da biologia reprodutiva, do metabolismo de carboidratos, produtos nitrogenados e cálcio dos moluscos da espécie *Subulina octona* frente à infecção pelo digenético *Paratanaisia bragai* apresentou alterações importantes para a compreensão da relação parasito x hospedeiro, porém alguns pontos ainda precisam ser esclarecidos.

O conjunto desses resultados delimita um cenário metabólico importante para compreender a dinâmica de *P. bragai* em relação ao seu hospedeiro intermediário e das estratégias para manutenção da vida desses moluscos frente à infecção e às alterações causadas por esta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEMA, C. M.; LOKER, E. S. Specificity and immunobiology of larval digenean-snail associations. *In*: FRIED, B.; GRACZYK, T. K. (Eds). **Advances in Trematode Biology**, CRC Press, p. 230-263, 1977.
- ALFARO-ALARCÓN, A.; MORALES, J. A.; VENEZIANO, V. et al. Fatal *Paratanaisia bragai* (Digenea:Eucotylidae) infection in Scarlet macaws (*Ara macao*) in Costa Rica. **Acta Parasitologica**, v. 60, p. 548-552, 2015.
- ALMEIDA, M. N.; MOTA, G. G. Ecologia, reprodução e crescimento da concha de *Leptinaria unilamellata* (D'Orbigny) (Pulmonata, Subulinidae) em condições naturais. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 18, n. 1, p. 23-28, 2011.
- ARAÚJO, J. L. B.; BESSA, E. C. A. Moluscos de importância econômica no Brasil. II. Subulinidae, *Subulina octona* (Bruguière) (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata, Stylommatophora). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 10, p. 489-497, 1993. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-81751993000300016>.
- ARAÚJO, J. L. B.; KELLER, D. G. Moluscos de importância econômica no Brasil. III. Subulinidae, *Leptinaria unilamellata* (Orbigny) (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata, Stylommatophora). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 10, n. 03, p. 499-507, 1993.
- ARNIZAUT, A. B.; HAYES, L.; OLSEN, G. H. et al. An epizootic of *Tanaisia bragai* in a captive population of Puerto Rican plain pigeon (*Columba inornata wetmorei*). **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 653, p. 202-205, 1992.
- BARBOSA, F. S. **Tópicos em Malacologia Médica**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1995. 314p.
- BASCH, P. F. Intermediate host specificity in *Schistosoma mansoni*. **Experimental Parasitology**, v. 39, p. 150-159, 1976.
- BAUDOIN, M. Host castration as a parasitic strategy. **Evolution**, v. 29, p. 335-352, 1975.
- BECKER, W. Metabolic interrelationship of parasite trematodes and molluscs, especially *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v. 63, p. 101-111, 1980.
- BEEBY, A.; RICHMOND, L. Differential growth rates and calcium-allocation strategies in the garden snail *Cantareus aspersus*. **Journal of Molluscan Studies**, vol. 73, p. 105-112, 2007.

BESSA, E. C. A.; ARAÚJO, J. L. B. Ocorrência de autofecundação em *Subulina octona* (Bruguière) (Pulmonata, Subulinidae) sob condições de laboratório. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 12, n. 3, p. 719-723, 1995b.

BESSA, E. C. A.; ARAÚJO, J. L. B. Oviposição, tamanho de ovos e medida do comprimento da concha em diferentes fases do desenvolvimento de *Subulina octona* (Bruguière) (Pulmonata, Subulinidae) em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 12, n. 3, p. 647-654, 1995a.

BESSA, E. C. A.; LIMA, W. S.; CURY, M. C.; ARAÚJO, J. L. B. Desenvolvimento biológico de *Angiostrongylus vasorum* (Baillet) Kamensnky (Nematoda, Angiostrongylidae) em *Subulina octona* Bruguière (Mollusca, Subulinidae) em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 17, n. 1, p. 29-41, 2000.

BIRDLIFE INTERNATIONAL. Country profile: Brazil. Disponível em: <http://www.birdlife.org/datazone/country/brazil>. Acessado em 24/04/2020 às 22:25.

BONFIM, T. C. S.; MALDONADO, A.; TUNHOLI, V. M.; TUNHOLI-ALVES, V. M.; FARO, M. J.; MOTA, E. M.; SILVA, T. C. B.; PINHEIRO, J. GARCIA, J. S. Biochemical and histopathological alterations in *Biomphalaria glabrata* due to co-infection by *Angiostrongylus cantonensis* and *Echinostoma paraensei*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 115, p. 80-85, 2014.

BRANDOLINI, S. V. P. B. **Biologia de *Tanaisia (Paratanaisia) bragai* (Santos, 1934) (Digenea, Eucotylidae)**. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Instituto de Medicina Veterinária, Departamento de Parasitologia Veterinária. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, 2000.

BRANDOLINI, S. V. P. B.; AMATO, S. B. Desenvolvimento larval de *Paratanaisia bragai* (Santos) (Digenea, Eucotylidae) sob condições experimentais. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 23, n. 4, p. 1097-1100, 2006. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-81752006000400017>.

BRANDOLINI, S. V. P. B.; AMATO, S. B.; PEREIRA, A. A. Relacionamento de *Tanaisia bragai* (Digenea, Eucotylidae) e seu hospedeiro intermediário, *Subulina octona* (Gastropoda, Subulinidae) sob condições experimentais. **Parasitologia al día**, v. 21, p. 109-113, 1997. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-07201997000300008>.

BRENER, B.; TORTELLY, R.; MENEZES, R. C.; MUNIZ-PEREIRA, L. C.; PINTO, R. M. Prevalence and pathology of the nematode *Heterakis gallinarum*, the trematode *Paratanaisia bragai*, and the protozoan *Histomonas meleagridis* in the turkey, *Meleagris gallopavo*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 6, p. 677-681, 2006.

BROCKELMAN, C. R.; CHUSATAYANOND, W.; BAIDIKUL, V. Growth and localization of *Angiostrongylus cantonensis* in the molluscan host *Achatina fulica*. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 7, p. 30–37, 1976.

CABLE, R. M. Parthenogenesis in parasitic helminthes. **American Zoologist**, v. 11, p. 267–272, 1971.

CALDEIRA, R. L.; MENDONÇA, C. L. G.; GOVEIA, C. O.; LENZI, H. L.; GRAEFF-TEIXEIRA, C.; LIMA, W. S.; MOTA, E. M.; PECORA, I. L.; MEDEIROS, A. M. Z.; CARVALHO, O. S. First record of molluscs naturally infected with *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) (Nematoda: Metastrongylidae) in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 7, p. 887-889, 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762007000700018>

CARDOZO, S. P.; YAMAMURA, M. H. Parasitas em produção de frangos no sistema de criação tipo colonial/caipira do Brasil. **Ciências Agrárias**, v. 25. n. 1, p. 63-74, 2004.

CARNEIRO, J. R.; LUSTOSA, E. S.; PEREIRA, E.; CARVALHO, E. D.; NAPOLI, M. A. Incidência de ecto e endoparasitos de pombos (*Columba livia domestica*) em Goiânia. **Revista de Patologia Tropical**, v. 4, p. 39-44, 1975.

CAVALCANTI, C. A. T.; NUNES, V. S. O tráfico da avifauna no nordeste brasileiro e suas consequências socioambientais. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, v. 6, n. 2, p. 405-415, 2019. <https://doi.org/10.4025/revcivet.v6i2.44117>

D'ÁVILA, S.; MANSO, P. P. A.; BESSA, E. C. A.; RODRIGUES, A. L. A. Morphological and morphometric study of pre-ovigerous and post-ovigerous adults of *Tanaisia* (*Paratanaisia*) *bragai* (Santos, 1934) (Digenea, Eucotylidae). **Revista Brasileira de Zoociências**, v. 18, n. 2, p. 107-118, 2017.

D'ÁVILA, S.; BESSA, E. C. de. A. Influência do substrato sobre a reprodução de *Subulina octona* (Brugüière) (Mollusca, Subulinidae), sob condições de laboratório. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 22, n. 1, p. 197-204. 2005.

DE CARLI, G. A. **Diagnóstico laboratorial das parasitoses humana: métodos e técnicas**. Rio de Janeiro: MEDSI Editora Médica e Científica; 1994.

DISCOVER LIFE. Map of *Subulina octona* Disponível em: <<http://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Subulina+octona>>. Acesso em: 03/04/2020.

DUARTE, M. J. de. F. **O ciclo evolutivo de *Postharmostomum gallinum* Witenberg, 1923, no estado do Rio de Janeiro, Brasil (Trematoda, Brachylaemidae)**. 1977. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Instituto de Medicina Veterinária, Departamento de

Parasitologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, 1977.

DURÇO, E.; MATOS, F.; PILATE, V.; CORTEZ, L.; BESSA, E. A.; SILVA, L. Estudo comportamental comparado entre *Subulina octona* (Brugüière, 1789) e *Leptinaria unilamellata* (d'Orbigny, 1835) (Mollusca: Subulinidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 15, n. 1,2,3, p. 97 – 105, 2013.

FARO, M. J.; PERAZZINI, M.; CORRÊA, L. S.; MELLO-SILVA, C. C.; PINHEIRO, J.; MOTA, E. M.; SOUZA, S.; ANDRADE, Z.; MALDONADO JR., A. Biological, biochemical and histopathological features related to parasitic castration of *Biomphalaria glabrata* infected by *Schistosoma mansoni*. **Experimental Parasitology**, v. 134, p. 228 – 234, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2013.03.020>.

FERREIRA, P.; SOARES, G. L. G.; D'AVILA, S.; BESSA, E. C. A. The influence of caffeine and thymol on the survival, growth and reproduction of *Subulina octona* (Brugüière, 1789) (Mollusca, Subulinidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 4, p. 945-952, 2009.

FREITAS J.F.T. Revisão da família Eucotylidae Skrjabin, 1924 (Trematoda). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 49, p. 33-271, 1951.

FREITAS, J. F. T. de. Nota sobre *Tanaisia inopina* Freitas, 1951 (Trematoda, Eucotylidae). **Atas da Sociedade de Biologia, Rio de Janeiro**, v. 3, n. 6, p. 2-4. 1959.

GOMES, D. C.; MENEZES, R. C.; TORTELLY, R.; PINTO, R. M. Pathology and first occurrence of the kidney trematode *Paratanaisia bragai* (Santos, 1934) Freitas, 1959 (Digenea: Eucotylidae) in *Phasianus colchicus* L., 1758, from Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 3, p. 285-288, 2005.

GOMOT, P.; GOMOT, L.; GRIFFOND, B. Evidence for a light compensation of the inhibition of reproduction by low temperatures in the snail *Helix aspersa*. Ovotestis and albumen gland responsiveness to different conditions of photoperiods and temperatures. **Biology of Reproduction**, v. 40, n. 6, p. 1237-1245, 1989.

GOUDSMIT, E. M.; ASHWELL, G. Enzymatic synthesis of galactogen in the snail, *Helix pomatia*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 19, p. 417-422, 1965. DOI: 10.1016/0006-291X(65)90139-7

JOOSSE, J. Hormone mollusks. In: JAFER, H.; DWER, R.G.H. **Invertebrate Endocrinology**. New York, USA, 1988.

KANEV, I.; RADEV, V.; FRIED, B. Family Eucotylidae Cohn, 1904. In: GIBSON, D. J.; BRAY, R. A.; JONES, A. (Eds). **Keys to the trematoda**. Wallingford: CAB International, v. 1, 2002. p. 147-152.

KELLER, G. G.; ARAÚJO, J. L. B. Ciclo evolutivo de *Paratanaisia bragai* (Santos, 1934) (Trematoda, Eucotylidae) como novo hospedeiro intermediário no Brasil: *Leptinaria unilamellata* (D'Orbigny, 1835) (Gastropoda, Pulmonata, Subulinidae) em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 1, n. 2, p. 89 – 92, 1992.

KUMAR, B. M.; TAIBUR, R.; SUSHANTA, G.; SAIDUL, I. On the incidence and pathology of *Paratanaisia bragai* dos Santos, 1934 (Freitas, 1959) infection in domestic pigeon (*Columba livia*). **Veterinary Parasitology**, v. 23, n. 2, p.159-161, 2009.

KUMAR, M. A.; KUMAR, D.; PALANIVELU, M.; ANNAMALAI, L.; MATHESH, K.; SINGH, R.; SHARMA, A. K.; DHAMA, K. Pathological and molecular studies of the renal trematode *Paratanaisia bragai* in Indian peafowls (*Pavo cristatus*). **Acta Parasitologica**, v. 63, p. 214–219, 2018. <https://doi.org/10.1515/ap-2018-0025>

LIE, K. J. Survival of *Schistosoma mansoni* and other trematode larvae in *Biomphalaria glabrata*: a discussion of interference theory. **Tropical and Geographical Medicine**, v. 34, p. 111-122, 1982.

LIMA, M. G.; TUNHOLI-ALVES, V. M.; BONFIM, T. C. S.; GAUDÊNCIO, F. N.; GARCIA, J. S.; MALDONADO, A. JR.; PINHEIRO, J.; THIENGO, S.C. Effects of experimental *Angiostrongylus cantonensis* infection on the reproductive biology of *Biomphalaria straminea* and *Biomphalaria tenagophila*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 149, p.106–113, 2017. DOI: 10.1016/j.jip.2017.08.006.

LIMA, M. G.; TUNHOLI-ALVES, V. M.; GAUDÊNCIO, F. G.; MARTINS, F. G.; CASTRO, R. N.; THIENGO, S. C.; GARCIA, J. S.; MALDONADO, A.; PINHEIRO, J. The influence of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda, Metastrongylidae) infection on the aerobic metabolism of *Biomphalaria straminea* and *Biomphalaria tenagophila* (Mollusca, Gastropoda). **Experimental Parasitology**, v. 171, p. 1-9, 2016. DOI:10.1016/j.exppara.2016.10.010

LOPES, J. C. A. Operações de fiscalização da fauna: análise, procedimentos e resultados. In: **Animais Silvestres: vida à venda**. 2. ed. Brasília, DF: Dupligráfica; RENCTAS, p. 15-49, 2003.

LUPPI, M. M.; MELO, A. L. de.; MOTTA, R. O. C.; MALTA, M. C. C.; GARDINER, C. H.; SANTOS, R. L. Granulomatous nephritis in psittacines associated with parasitism by the trematode *Paratanaisia* spp. **Veterinary Parasitology**, v. 146, p. 363-366, 2007.

MAGALHÃES, A. C.; PINHEIRO, J.; MELLO-SILVA, C. C. Calcium mobilization in *Biomphalaria glabrata* exposed to different quantities of calcium carbonate. **Revista de Patologia Tropical**, v. 40, n. 1, p. 46-55, 2011. <https://doi.org/10.5216/rpt.v40i1.13916>

MALDONADO, J. F. Ciclo vital e biologia del *Platynosomum fastosum* Kossak, 1910 (Trematoda: Dicrocoelidae). **The Puerto Rico Journal of Public Health and Tropical Medicine**, v. 21, n. 1, p. 40-60. 1945b.

MALDONADO, J. F. The life cycle of *Tamerlania bragai*, Santos, 1934 (Eucotylidae), a kidney fluke of domestic pigeons. **Journal of Parasitology**, v. 31, n. 5, p. 306 – 314, 1945a. <http://dx.doi.org/10.2307/3273085>.

MARTINS, F. G. ***Bulimulus tenuissimus* (mollusca) como novo hospedeiro experimental para *Angiostrongylus cantonensis* (nematoda), um estudo morfológico e fisiológico da interação parasito-hospedeiro**. 2018. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Instituto de Medicina Veterinária, Departamento de Parasitologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, 2018.

MASSA, D. R.; CHEJLAVA, M. J.; FRIED, B.; SHERMA, J. High performance column liquid chromatographic analysis of selected carboxylic acids in *Biomphalaria glabrata* patently infected with *Schistosoma mansoni*. **Parasitology Research**, v. 101, p. 925-928, 2007. DOI: 10.1007/s00436-007-0563-2

MENDES, F. L. S. Apreensão de aves silvestres brasileiras que foram exportadas ilegalmente para Portugal. **Revista Brasileira de Zoociências**, v. 19, n. 1, p. 56-66, 2018.

MENEZES, R. C.; MATTOS JR. D. G.; TORTELLY, R.; MUNIZ-PEREIRA, L. C.; PINTO, R. M.; GOMES, D. C. Trematodes of free range reared guinea fowls (*Numida meleagris* Linnaeus, 1758) in state os Rio de Janeiro, Brazil: morfology and pathology. **Avian Pathology**, v. 30, p. 209-214, 2001.

MINCHELLA, D. J. Host-history variation in response to parasitism. **Parasitology**, v. 90, p. 205-216, 1985. <https://doi.org/10.1017/S0031182000049143>.

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

NASCIMENTO, C. A. A.; TOLEDO, A. M . O.; BESSA, E. C. A.; ABREU, P. F. Influência de *Furcraea foetida* (L.) Haw. no comportamento de *Subulina octona* (Bruguière, 1789) (Mollusca, Subulinidae). **Revista Brasileira de Zoociências**, v.19, n. 3, p. 65-77, 2018b.

NASCIMENTO, C. A. A.; TOLEDO, A. M. O.; BESSA, E. C. A.; ABREU, P. F. Influência

de *Furcraea foetida* (L.) Haw. sobre a sobrevivência, crescimento e reprodução de *Subulina octona* (Brugüiere, 1789) (Mollusca, Subulinidae). **Revista Brasileira de Zoociências**, v.19, p. 31-43, 2018a.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, 2011. 6. ed.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de bioquímica de Lehninger. Porto Alegre: **Artmed**, 2018. 7. ed.

PASCHOAL; S. V.; AMATO, S. B. *Eurytrema coelomaticum* (Giard & Billet) em *Bradybaena similis* (Ferussac) (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 similis* (Férussac,1821) (Mollusca, Gastropoda). **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 39, n. 2, 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 similis* (Gastropoda, Xanthonychidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, p. 407- 410, 1994. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761994000300020>

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 similis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 90, n. 5, p. 635-638, 1995. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761995000500019>.

PINHEIRO, J.; FRANCO-ACUÑA, D. O.; OLIVEIRA-MENEZES, A.; BRANDOLINI, S. V. P. B.; DE SOUZA, W.; DAMATTA, R. A. Ultrastructure of the sporocysts of *Eurytrema coelomaticum* (Giard Et Billet, 1892) Looss, 1907. **Veterinary Parasitology**, v. 182, p. 201-212, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.044>

PINHEIRO, J.; GOMES, E. M.; CHAGAS, G. M. Aminostransferases activity in the hemolymph of *Bradybaena similis* under starvation. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v 96, p. 1161-1164, 2001.

PINHEIRO, J.; MALDONADO, A. J. R.; LANFREDI, R. M. Physiological changes in *Lymnaea columela* (Say, 1818) (Mollusca, Gastropoda) in response to *Echinostoma paraensei* Lie and basch, 1967 (Trematoda, Echinostomatidae) infection. **Parasitology Research**, v. 106, p. 55-59, 2009. DOI: 10.1007/s00436-009-1630-7

PINTO, R. M.; MENEZES, R. C.; TORTELLY, R. Systematic and pathology study of *Paratanaisia bragai* (Santos, 1934) Freitas, 1959 (Digenea, Eucotylidae) infestation in ruddy ground dove *Columbina talpacoti* (Temminck, 1811). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n.4, p. 472-479, 2004.

REY, L. **Parasitologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 883p.

ROTSTEIN, D. S.; FLOWERS, J. R.; WOLFE, B. A.; LOOMIS, M. Renal trematodiasis in captive double-toothed barbets (*Lybius bidentatus*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 36, p. 124-126, 2005.

RUPPERT, E. E; FOX, R. S; BARNES, R. D. **Zoologia dos invertebrados: Uma abordagem Funcional-evolutiva**. 7e. São Paulo: Roca, 2005. 1145p.

SANTI, M.; ANDRE, M. R.; HOPPE, E. G. L.; WERTHER, K. Occurrence of *Paratanaisia confusa* Freitas, 1951 in free-living guira cuckoo (*Guira guira*, Cuculiformes: Crotophagidae). **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 26, n. 2, p. 248-251, 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612017014>

SANTI, M.; COUTO, C.; WERTHER, K. Occurrence of *Paratanaisia* spp. Freitas, 1951 in a domiciled cockatiel (*Nymphicus hollandicus*, Psittaciformes: Cacatuidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 27, n. 4, 2018. <https://doi.org/10.1590/s1984-296120180034>

SANTOS, T. V. **Variabilidade conquiológica, anatômica e molecular de Subulina octona (Bruguiere, 1789) (Mollusca, Gastropoda, Subulinidae)**. 2012. 117F. Dissertação (Mestre em Ciências Biológicas) – Pós Graduação em Ciências Biológicas, Mestrado em Comportamento e Biologia Animal, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, 2012.

SANTOS, V. Monostomose renal de aves doméstica. **Revista do Departamento Nacional de Produção Animal**, v. 1, p. 203-215, 1934.

SHAH, S. S. A.; KHAN, A. **One Health and Parasites**. In: YASOBANT, S.; SAXENA, D. Global Applications of One Health Practice and Care. Medical Info Science Reference, 2019. 306p.

SILVA, L. D.; ALVES, S. M. F.; LEICHTWEIS, K. S.; SANTOS, D. B.; CASTRO, A. M.; MELLO-SILVA, C. C.; MACHADO, K. B.; REZENDE, H. H. A.; BEZERRA, J. C. B. Cálcio exógeno como biomarcador do uso de via metabólica alternativa por *Biomphalaria* spp (Mollusca, Planorbidae). **Revista de Biologia Neotropical**, v. 16, n. 2, p. 6169, 2019.

SILVA, T. M.; PAVAN, L. F.; GUIMARÃES- OKAMOTO, P. T. C. et al. First record of *Paratanaisia bragai* (Digenea: Eucotylidae) in blue and gold macaw (*Ara ararauna*). **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 25, p. 112-115, 2016.

SOUZA, B. A.; SILVA, L. C.; BESSA, E. C. A. Alterações de crescimento, fecundidade e sobrevivência em *Subulina octona* exposta aos extratos aquosos de *Bidens pilosa* e *Mikania glomerata*. **Revista Brasileira de Zoociências**, v. 14, n. 1, 2, 3, p. 201-211, 2012.

TARODA, A.; BARROS, L. D.; ZULPO, D. L.; CUNHA, I. A. L.; PAIVA, M. C. D. C.; SAMMI, A. S., et al. Occurrence of gastrointestinal and renal helminths in *Zenaida auriculata* (Des Murs, 1847) trap-captured from Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 3, p. 415-419, 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612013000300016>.

TAVELA, A. O.; CARRETTA JUNIOR, M.; OLIVEIRA, A. R.; CARNEIRO, F. T.; SILVA, V. H. D.; BRAGA, F. R.; PEIXOTO, J. V.; CARVALHO, G. D.; ARAÚJO, J. V.; PAULA, T. A. R. Parasitism by *Paratanaisia bragai* (Digenea, Eucotylidae) in common waxbill (*Estrilda astrild*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 4, p. 1276-1280, 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-7136>

TEODORO, T. G. W.; OLIVEIRA JUNIOR, I. M.; LIMA, H. C.; REIS, M. O.; MIRANDA, J. L.; FAVORETTO, S. M.; PINTO, H. A.; LACRETA JÚNIOR, A. C. C.; WOUTERS, A. T. B.; VARASCHIN, M. S. *Psittacara leucophthalmus* (Aves: Psittacidae) como um novo hospedeiro de *Paratanaisia bragai* (Trematoda: Eucotylidae) no Brasil: achados clínicos e patológicos: relato de caso. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, n. 5, p.1569-1576, 2018. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-10300>.

THOMPSON, S. N.; LEE, R. K. W. Comparison of starvation and infection by *Schistosoma mansoni* on tissue viability and the ³¹P NMR spectrum of *Biomphalaria glabrata*. **Zeitschrift fur Parasitenkunde**, v. 72, n. 3, p. 417-421, 1986.

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, p. 192-195, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2010.09.006>.

TUNHOLI, V. M.; TUNHOLI-ALVES, V. M.; LUSTRINO, D.; CASTRO, R. N.; SANT'ANA, L.; GARCIA, J. Aerobic to anaerobic transition in *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) infected with different miracidial doses of *Echinostoma paraensei* (Lie and Basch, 1967) by high-performance liquid chromatography. **Experimental Parasitology**, v. 133, p. 403-410, 2013.

TUNHOLI-ALVES, V. M.; TUNHOLI, V. M.; CASTRO, N.; SANT'ANA, L. O.; SANTOS-AMARAL, L.; OLIVEIRA, A. P. M.; GARCIA, J.; THIENGO, S. C.; PINHEIRO, J.; MALDONADO, A. Activation of anaerobic metabolism in *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: gastropoda) experimentally infected by *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda,

Metastrongylidae) by high-performance. **Parasitology International**, v. 63, p. 64-68, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2013.09.004>

TUNHOLI-ALVES, V. M.; TUNHOLI, V. M.; LUSTRINO, D.; SANTOS-AMARAL, L.; THIENGO, S. C.; PINHEIRO, J. Changes in the reproductive biology of *Biomphalaria glabrata* experimentally infected with the nematode *Angiostrongylus cantonensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 108, p. 220-223, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2011.08.009>

UNWIN, S.; CHANTREY, J.; CHATTERTON, J.; ALDHOUN, J. A.; LITTLEWOOD, D. T. J. Renal trematode infection due to *Paratanaisia bragai* in zoo housed Columbiformes and a red bird-of-paradise (*Paradisaea rubra*). **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 2, p., 32-41, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijppaw.2012.11.001>.

VAN ELK, R.; JOOSSE, J. The UDP-galactose 4-epimerase of the albumen gland of *Lymnaea stagnalis* and the effects of photoperiod, starvation and trematode infection on its activity. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 70, n. 1, p.45-52, 1981.

VAN WEEL, P. B. Hepatopancreas?. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 47, n. 1, p. 1-9, 1974.

WILBUR, K.; TAMPA, A. S. Physiological changes in Gastropods during egg shell calcification. **Malacologia**, vol. 18, p. 561-562, 1979.

WISNIVESK, Y. C. **Ecologia y epidemiologia de las infecciones parasitarias**. Argentina: Libro Universitario Regional Press, 2003. 398 p.

XAVIER, V. B. **Morfologia de ovos, larvas e adultos de *Paratanaisia bragai* (Santos, 1934) Freitas, 1959 (Digenea, Eucotylidae) e histopatologia do rim de *Columba livia* (Gm.) infectado**. 2015. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Instituto de Medicina Veterinária, Departamento de Parasitologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, 2015.

XAVIER, V. B.; OLIVEIRA-MENEZES, A.; SANTOS, M. A. J.; AMATO, S. B.; TORRES, E. J. L.; PINHEIRO, J. S.; BRANDOLINI, S. V. P. B. Histopathological changes in the kidneys of vertebrate hosts infected naturally and experimentally with *Paratanaisia bragai* (Trematoda, Digenea). **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 24, n. 2, p. 241 – 246, 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612015017>.

YAMAGUTI, S. **Systema Helminthum**. Vol.1. The Digenetic Trematodes of Vertebrates. Part I and II. Interscience Publishers, London and New York, 1958. 1575 pp.

ANEXOS



UFRRJ
Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro

**Comissão de Ética no
Uso de Animais**
Instituto de Veterinária



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do perfil metabólico de *Subulina octona* Bruguière, 1789 (Gastropoda, Subulinidae) experimentalmente infectada por *Paratanaia bragai* (Santos, 1934) (Digenea, Eucotylidae)", protocolada sob o CEUA nº 2225230617 (ID 000857), sob a responsabilidade de **Jairo Pinheiro da Silva e equipe; TATIANE CRISTINA DOS SANTOS BONFIM** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) na reunião de 08/12/2017.

We certify that the proposal "METABOLIC PROFILE OF SUBULINA OCTONA BRUGIÈRE, 1789 (GASTROPODA, SUBULINIDAE) EXPERIMENTALLY INFECTED WITH PARATANAIA BRAGAI (SANTOS, 1934) (DIGENEA, EUCOTYLIDAE)", utilizing 20 Birds (males and females), protocol number CEUA 2225230617 (ID 000857), under the responsibility of **Jairo Pinheiro da Silva and team; TATIANE CRISTINA DOS SANTOS BONFIM** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Veterinary Institute of Rural Federal University of Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) in the meeting of 12/08/2017.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [01/2018](#) a [02/2020](#)

Área: [Parasitologia Animal](#)

Origem: [Não aplicável biotério](#)

Espécie: [Aves](#)

sexo: [Machos e Fêmeas](#)

idade: [1 a 10 anos](#)

N: [20](#)

Linagem: [Diversas raças](#)

Peso: [50 a 150 g](#)

Local do experimento: Laboratório de Parasitologia, Área de Biologia, Departamento de Biologia Animal, ICBS, UFRRJ, Campus Sede.

Seropédica, 30 de julho de 2019

Prof. Dr. Fabio Barbour Scott
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Carlos Alexandre Rey Matias
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

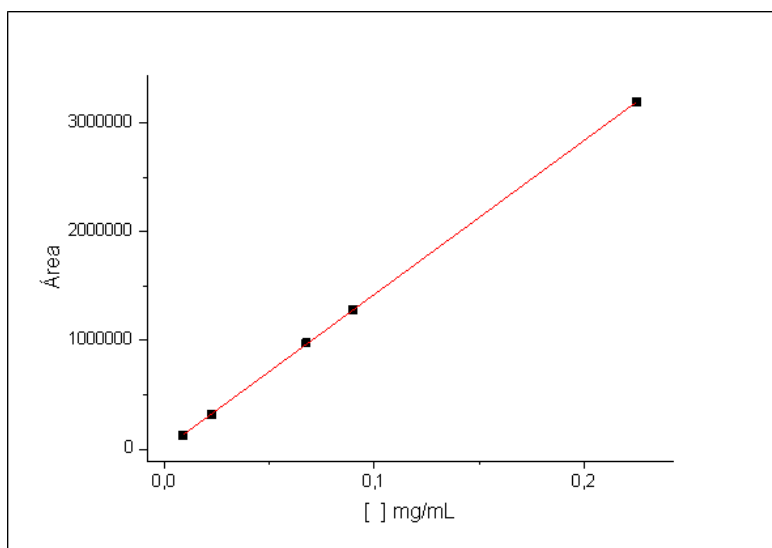
ÁCIDO OXÁLICO

Equation	$y = a + b \cdot x$	
Plot	B	
Weight	No Weighting	
Intercept	$6317,15453 \pm 6837,12977$	A
Slope	$1,41854E7 \pm 60474,28274$	B (14185400)
Residual Sum of Squares	$3,25E+13$	
Pearson's r	$9,99970E-01$	
R-Square (COD)	0,99995	
Adj. R-Square	0,99993	

$$Y = A + B \cdot X$$

$$X = (Y - A) / B$$

$$X = (Y - 6317,15453) / 14185400$$



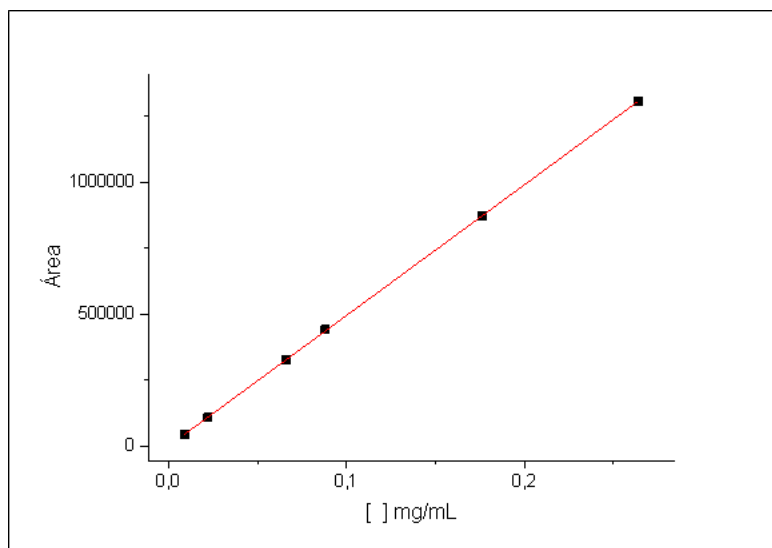
ÁCIDO PIRUVICO

Equation	$y = a + b \cdot x$	
Plot	B	
Weight	No Weighting	
Intercept	$1706,8871 \pm 1792,85096$	A
Slope	$4945120,92812 \pm 13036,01249$	B
Residual Sum of Squares	328569000000,00000	
Pearson's r	0,99999	
R-Square (COD)	1,00	
Adj. R-Square	1,00	

$$Y = A + B \cdot X$$

$$X = (Y - A) / B$$

$$X = (Y - 1706,8871) / 4945120,92812$$



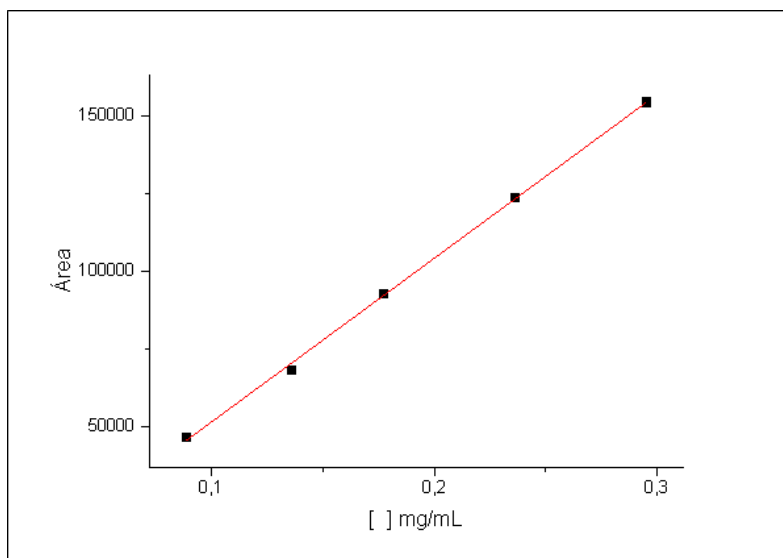
ÁCIDO SUCCINICO

Equation	$y = a + b \cdot x$	
Plot	B	
Weight	No Weighting	
Intercept	$-1331,36364 \pm 1738,72635$	A
Slope	$527937,08958 \pm 8680,56877$	B
Residual Sum of Squares	599905235227,000	
Pearson's r	1,000	
R-Square (COD)	1,00	
Adj. R-Square	1,00	

$$Y = A + B \cdot X$$

$$X = (Y - A) / B$$

$$X = (Y + 1331,36364) / 527937,08958$$



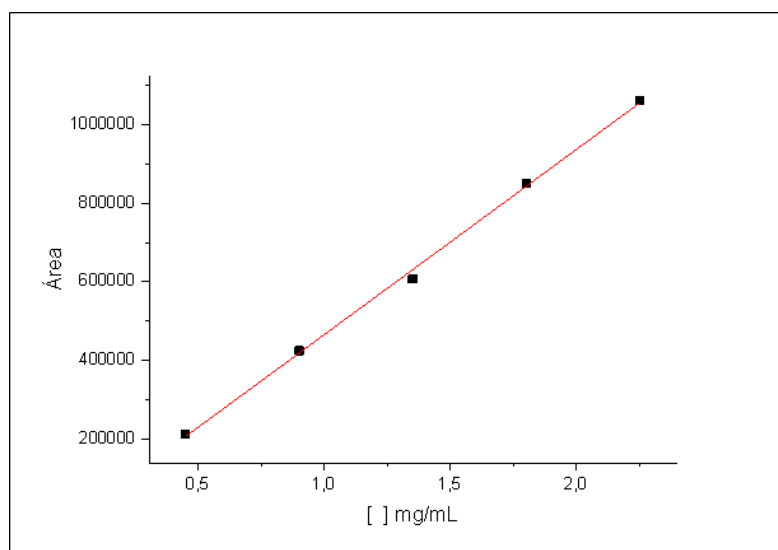
ÁCIDO LÁTICO

Equation	$y = a + b \cdot x$	
Plot	B	
Weight	No Weighting	
Intercept	$-6619,15 \pm 16187,66647$	A
Slope	$471758,99201 \pm 10836,51217$	B
Residual Sum of Squares	7,15E+13	
Pearson's r	9,992100E-01	
R-Square (COD)	0,99842	
Adj. R-Square	0,99789	

$$Y = A + B \cdot X$$

$$X = (Y - A) / B$$

$$X = (Y + 6619,15) / 471758,99201$$





Evaluation of the reproductive profile of *Subulina octona* (Gastropoda, Subulinidae) experimentally infected by *Paratanaisia bragai* (Digenea, Eucotylidae)

T. C. S. Bonfim^a, F. G. Martins^{a,b}, V. M. Tunholi-Alves^a,
M. A. J. Santos^c, S. V. P. B. Brandolini^c, J. Pinheiro^{a,b*}

^aUniversidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Seropédica, RJ, Brasil

^bUniversidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Ciências Fisiológicas, Seropédica, RJ, Brasil

^cUniversidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Biologia Animal, Seropédica, RJ, Brasil

*e-mail: jps@ufrj.br

Received: January 15, 2020 – Accepted: May 13, 2020 – Distributed: November 30, 2021
(With 2 figures)

Abstract

Snails infected by trematodes may increase or decrease their reproductive activity in response to the presence of infection. Our aim was to verify the reproductive alterations in *Subulina octona* after infection by *Paratanaisia bragai*. The infected snails were individually exposed for 24 hours to 20 parasite eggs and four groups were formed (10, 20, 30 and 40 d.p.i. - days after infection), along with control groups. Every 10 days, the number of eggs in the reproductive tract, number of eggs hatched, galactogen content and histopathological changes were evaluated. The reproductive in the control and infected snails presented an alternating pattern, where periods of high production of eggs and newly hatched were followed by periods of low production. However, in relation to the amount of galactogen, both control and infected groups followed the same pattern of variation. In the histology, we observed the presence of male and female gametes with marked reduction in the number of oocytes. The results indicate that the intra-snail development of the parasite affects the reproductive biology of the host.

Keywords: digenetic trematode, host-parasite relationship, reproductive patterns.

Avaliação do perfil reprodutivo de *Subulina octona* (Gastropoda, Subulinidae) infectada experimentalmente por *Paratanaisia bragai* (Digenea, Eucotylidae)

Resumo

Moluscos infectados por trematódeos podem aumentar ou diminuir sua atividade reprodutiva em resposta à presença da infecção. Nosso objetivo foi verificar as alterações reprodutivas de *Subulina octona* após a infecção por *Paratanaisia bragai*. Os moluscos infectados foram individualmente expostos durante 24 horas a 20 ovos do parasito e quatro grupos foram formados (10, 20, 30 e 40 d.p.i. – dias pós infecção), com respectivos grupos controle. A cada 10 dias, o número de ovos no trato reprodutivo, o número de ovos eclodidos, o conteúdo de galactogênio e alterações histopatológicas eram avaliadas. O padrão reprodutivo nos moluscos controle e infectados evidenciou um comportamento alternante, nos quais períodos de alta produção de ovos e filhotes foram seguidos por períodos de baixa produção. No entanto, em relação ao conteúdo de galactogênio, moluscos controle e infectados seguiram o mesmo padrão de variação. Na histologia, observamos a presença de gametas masculinos e femininos com acentuada redução no número de óocitos. Os resultados indicam que o desenvolvimento intramolusco do parasito afeta a biologia reprodutiva do hospedeiro.

Palavras-chave: trematódeo digenético, relação parasito-hospedeiro, padrões reprodutivos.

1. Introduction

Paratanaisia bragai (Santos, 1934) Freitas, 1959 is a digenetic trematode able to parasite snails of the Family Subulinidae Fischer and Crosse, 1877, who acquire the infection by ingesting eggs present in the excretion products

of infected definitive hosts. Several species of wild and domestic birds can be used as the definitive host by the parasite, among them there are species with economic importance as *Gallus gallus domesticus* (L.); *Meleagris*

gallopavo L. and *Phasianus colchicus* L. (Santos, 1934 *apud* Pinto et al., 2004; Gomes et al., 2005; Brenner et al., 2006). The bird infection occurs by the ingestion of snails containing infective metacercariae, which develop into the adult stage in the host's renal collecting ducts (Santi et al., 2017).

The presence of this trematode has been recorded in South America, Central America, Oceania and Asia (Keller and Araújo, 1992; Kumar et al., 2009). In Brazil, we found records of the occurrence of *Paratanaisia* spp. in Paraná (Taroda et al., 2013), Goiás (Carneiro et al., 1975), Rio de Janeiro (Menezes et al., 2001; Santos, 1934 *apud* Pinto et al., 2004; Xavier et al., 2015), São Paulo (Silva et al., 2016; Santi et al., 2017; Santi et al., 2018) and Minas Gerais (Tavela et al., 2014; Teodoro et al., 2018). Most of these records involved birds care at veterinary hospitals, zoos or wildlife triage and conservation centers. These records show the great veterinary importance of trematodes from *Paratanaisia* genus, not only to the wildlife and its conservation but, also, by affecting domestic or domesticated birds, as parrots and cockatiel (Luppi et al., 2007; Santi et al., 2018). From the perspective of the *One Health* concept, where we must combine efforts from different areas to solve environmental, veterinary or human health problems, the study of *P. bragai* is even more important.

The biological cycle of this parasite was studied by Maldonado (1945), Keller and Araújo (1992) and Brandolini and Amato (2006), indicating the terrestrial snails *Subulina octona* (Bruguière, 1789) and *Leptinaria unilamelata* (d'Orbigny, 1835) as intermediate hosts in Brazil. These species are hermaphroditic animals considered to be agricultural pests and found in humid and shady places, such as flower gardens and vegetable gardens (Boffi, 1979; Araújo and Bessa, 1993). The participation of *S. octona* as intermediate host in the biological cycle of parasites of medical and veterinary importance increases the relevance of studies focusing on this species of snail (Durço et al., 2013).

Infection by larval trematodes can alter the reproductive activity of the snail host, making it important to observe parameters related to the ovipository activity and the eggs laid viability (Tunholi-Alves et al., 2011). Besides this, other indicators can also be evaluated to understand these changes, such as the galactogen content and the snail histopathology. Galactogen is a heteropolymer of galactose, synthesized in the albumen gland, as a constituent part of the perivitelline fluid, which is deposited inside the eggs to nutrition of embryos during their development and newly hatched snails (Gonot et al., 1989).

The reproductive behavior of snails during intramollusc digenetic larval development has been widely studied, especially in aquatic snails belonging to the Family Planorbidae Rafinesque, 1815 (Crews and Yoshino, 1990; Tunholi et al., 2011; Faro et al., 2013). However, there is scarcity of data in the literature on the behavior of terrestrial snails in response to infection by trematodes (Pinheiro and Amato, 1995).

Snails may increase its reproductive efforts in an attempt to compensate future losses, a phenomenon characterized

by Minchella (1985) and called as fecundity compensation. Tunholi et al. (2011) verified this phenomenon in *Riomphalaria giabrata* Say, 1818 experimentally infected with doses of 5 and 50 *Echinostoma paraensei* (Lie and Basch, 1967) miracidia. However, the infection by larval trematodes may lead to reduction of reproductive activity in snails, phenomenon called parasitic castration by Baudoin (1975), as observed by Pinheiro and Amato (1995) in the system *Eurytrema coelomaticum* (Giard et Billet, 1892) Looss, 1907/*Bradybaena similis* (Férussac, 1821). The snail may present a total interruption or partial reduction of reproductive activity resulting from the direct mechanical action of the parasite on the reproductive structures or indirect action, as decrease of the snail's energy reserves or interference in the neuroendocrine system.

Considering the wide geographical distribution of this trematode, it is important to understand the dynamics between this parasite and their hosts, mainly the intermediate snail host, an important target to control programs. Thus, is important understand the reproductive profile of the intermediate host to clarifying the ecological and population dynamics of *P. bragai*. The objective of this study was to verify the reproductive changes caused by *P. bragai* parasitism in the terrestrial snail *S. octona* through evaluation of the reproductive parameters (number of eggs hatched/snail and number of eggs in the reproductive tract/snail), galactogen determination and histopathological analysis of the snails.

2. Methodology

2.1. Snails collection and maintenance

The snails were collected near of the Institute of Biological and Health Sciences (ICBS) of Federal Rural University of Rio de Janeiro (UFRRJ) (Latitude: -22,7634; Longitude: -43,6882). Subsequently, they were taken to the Biophysics Laboratory of the Physiological Sciences Department, UFRRJ, Brazil. These snails were maintained in terrariums (20 cm long x 12 cm wide x 6 cm high), with a layer of approximately 2 cm of sterilized earth at the bottom, which was moistened with distilled water in alternate days.

The snails were fed with fresh lettuce leaves (*Lactuca sativa* L.) and freshly peeled vegetables: carrot (*Daucus carota* L.), zucchini (*Cucurbita pepo* L.) and chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Swartz, 1800). In addition, the diet was supplemented with ration for bird's growth enriched with calcium carbonate (CaCO₃), in proportion 3:1 (Bessa and Araújo, 1995).

The terrariums were cleaned twice a week, when the feed offered was renewed, the hatched snails were transferred to another similar terrarium, where they were maintained until reaching a shell length greater than 10mm and reaching sexual maturity (confirmed by the presence of eggs observed by shell transparency) for to be used in experimental procedures.

2.2. Experimental infection

The specimens of *P. bragai* used in this study were obtained from naturally infected pigeons (*Columba livia* Gmelin, 1789) collected in the Seropédica municipality, RJ, Brazil (Latitude: 22°44'38"S; Longitude: 43°42'27"W; Altitude: 26m) in 2018. The Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA) of the Veterinary Institute of UFRJ approved this stage of the experiment (Process Number 2225230617). The identification of the adult digenetic trematodes was made according to Yamaguti (1958) and Kanev et al. (2002).

The pigeons infection was stated by excretions examination (De Carli, 1994), evidencing the presence of helminth eggs. Therefore, these naturally infected pigeons were necropsied and the adult trematodes were collected from kidney. After this, adult specimens were dissected to collect the eggs directly from the uterine cavity. The snails were previously subjected to food deprivation for 24 hours, followed by exposure to the trematode eggs.

The study used a total of 800 snails ($n=800$). Four hundred specimens of *S. octona* were exposed to the parasite in 24-well plates, each with one piece of chayote and 20 parasite eggs. The snails remained in these conditions for 24 hours to feed on all the chayote offered. The exposed snails were divided into 4 groups: 10, 20, 30 and 40 days after infection (d.p.i.) with 100 snails each group. In order to maintain population density along the experimental groups, another group of 100 snails were infected following the same procedures described before and maintained for replacement of dead mollusks throughout the observation period.

The control groups, consisting of 400 uninfected snails, divided in 4 groups of 100 specimens, were also placed in 24-well plates containing one piece of chayote and 20 μ l of distilled water for 24 hours.

The snails were placed in terrariums containing 50 snails each and 2 cm of sterilized earth, moistened with distilled water.

2.3. Experimental analyses

The snails were monitored for 40 days. Every 10 days, the numbers of hatched eggs and eggs in the adult reproductive tract were recorded. After this step, 97 snails from each group (control and infected) were dissected and the albumen gland was removed, weighed, identified and stored at -20 °C for further analysis of the galactogen content. All collection of biological material occurred in ice bath.

The galactogen content of the albumen gland was determined according Summer (1924) and Pinheiro and Gomes (1994) and the results were expressed as mg galactose/g tissue, fresh weight.

In the same intervals, three snails from each group (infected and control) were dissected for shell removal and placed in the Duboscq-Brazil fixative (Fernandes, 1949) for 48 h for histological analysis. The tissues were processed according to routine histological techniques (Tolosa et al., 2003). Serial sections 5 μ m thick were obtained and stained with hematoxylin-eosin (HE) and

Gomori's trichrome. The slides were observed under an Olympus BX51 microscope and images were captured with the Olympus CellSens Standard software (CS-ST-V1, CellSens Standard, v.1.00).

2.4. Statistical analysis

The numerical results of the reproductive analysis were expressed as mean $\pm$ standard error of the mean and the control group was compared with the infected group through the t-test for unpaired data ($\alpha=5\%$). The relationship between infection time and reproductive parameters was determined by polynomial regression analysis (InStat, GraphPad, v.4.00, Prism, GraphPad, v.3.02, Prism Inc.).

3. Results

The experimental infection by *P. bragai* induced alterations in the reproductive biology, galactogen content and the tissue organization of the *S. octona* snails exposed to the parasite.

The total number of eggs observed inside the snails during the experimental period was, in average, 18.64 eggs/snail for the control group and 16.66 eggs/snail for the infected group, representing reduction of 10.62% in this parameter as consequence of the infection.

Reductions of 10.07%, 30.48% and 33.33% were observed in the number of hatched eggs per snail when analyzing the infected animals at 10 d.p.i. (2.50 ± 0.27), 20 d.p.i. (1.3 ± 0.24) and 40 d.p.i. (0.80 ± 0.01), respectively, compared to the control groups analyzed after the same period (2.78 ± 0.24 , 1.87 ± 0.34 and 1.2 ± 0.01 , respectively). Only snails analyzed after 40 days of exposure presented a significant difference in relation to the corresponding control group. However, increase of 12.04% was observed in infected snails at 30 d.p.i. (3.07 ± 0.84) compared to the control snails (2.74 ± 1.35) (Table 1).

In the analysis of the relation between the number of hatched eggs and time of infection, the same oscillating pattern was observed in both groups (uninfected and infected), presenting a negative relation between these parameters, with lower values for infected snails than control snails. The relation between the parameters analyzed for infected snails ($r^2=0.49$) was not significant, but there was a strong relation for uninfected snails ($r^2=0.91$) (Figure 1A).

Ten days after infection, infected snails (3.11 ± 0.20) showed significant reduction ($\alpha=0.001$) in the number of eggs observed in the reproductive tract per snail, equivalent to 34.94% in relation to the control group (4.78 ± 0.12). At 20 d.p.i., the opposite was observed, with an increase of 5.6% in this parameter in the infected snails (4.34 ± 0.15) in relation to the control (4.11 ± 0.16). From this time on, the number of eggs declined again by 5.96% after 30 d.p.i. (4.26 ± 0.17) and 5.17% after 40 d.p.i. (4.95 ± 0.12), respectively, compared to the control snails evaluated in the same period (4.53 ± 0.16 , 5.22 ± 0.07). The reduction observed in the number of eggs observed in the reproductive tract per snail of infected snails, after 40 days of infection was significant in relation to the control group (Table 1).

Table 1. Effects of the experimental infection by *Paratanaia bragai* on the reproductive parameters, expressed as mean $\pm$ standard error of the mean, of the intermediate host *Subulina octona* during 40 days after infection (d.p.i.).

Days post infection (d.p.i.)	Eggs in the reproductive tract/snail		Hatched eggs /snail		Galactogen (mg of galactose/g of tissue, wet weight)	
	Control	Infected	Control	Infected	Control	Infected
10	4.78 $\pm$ 0.12 ^a	3.11 $\pm$ 0.20 ^b	2.78 $\pm$ 0.24 ^a	2.50 $\pm$ 0.27 ^a	65.34 $\pm$ 3.84 ^a	63.65 $\pm$ 1.52 ^a
20	4.11 $\pm$ 0.16 ^a	4.34 $\pm$ 0.15 ^a	1.87 $\pm$ 0.34 ^a	1.3 $\pm$ 0.24 ^a	67.59 $\pm$ 2.54 ^a	79.60 $\pm$ 0.31 ^b
30	4.53 $\pm$ 0.16 ^a	4.26 $\pm$ 0.17 ^a	2.74 $\pm$ 1.35 ^a	3.07 $\pm$ 0.84 ^a	79.23 $\pm$ 1.86 ^a	93.55 $\pm$ 0.62 ^b
40	5.22 $\pm$ 0.07 ^a	4.95 $\pm$ 0.12 ^b	1.2 $\pm$ 0.01 ^a	0.80 $\pm$ 0.01 ^a	79.78 $\pm$ 0.60 ^a	74.12 $\pm$ 0.29 ^b

^{a,b} Means followed by different letters in the row differ from each other with significance of at least 5%.

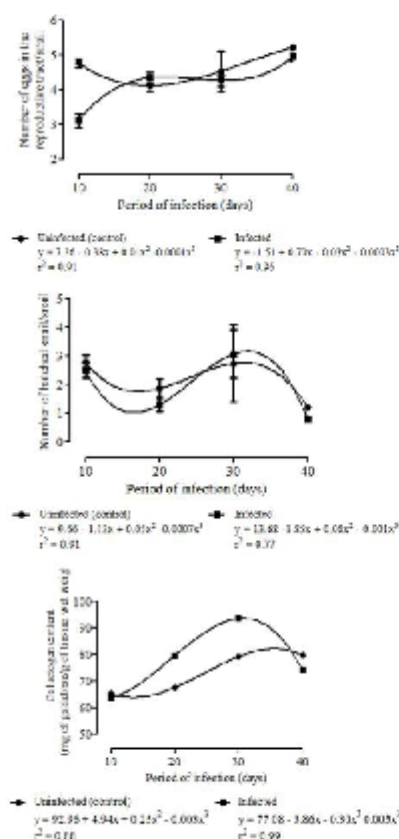


Figure 1. Relation between the period of infection and reproductive parameters analyzed in *Subulina octona* experimentally infected with *Paratanaia bragai*. A) number of eggs observed in the reproductive tract, B) number eggs hatched per snail; and C) the galactogen content in *S. octona* experimentally infected by *P. bragai*, and the pre patent development of infection, 40 days after infection (d.p.i.).

Polynomial regression analysis showed alternating reproductive pattern in uninfected *S. octona*, in which there was periods of higher egg production followed by a subsequent period of lower egg production, with a strong positive relation between the analyzed parameters. This analysis allowed to verify that as result of *P. bragai* infection, there was inversion of the reproductive pattern of *S. octona*, resulting in a negative relation between the parameters analyzed, in which the snails began with lower egg production, until 20 d.p.i., after that the reproductive investment increased (Figure 1B).

A reduction of 2.59% in the galactogen content in the infected snails' albumen gland after 10 d.p.i. (63.65 $\pm$ 1.52 mg of galactose/g of tissue, wet weight) was observed in comparison with the control (65.34 $\pm$ 3.84 mg of galactose/g of tissue, wet weight). After 20 d.p.i. and 30 d.p.i. significant increases ($\alpha = 0.01$) were observed of 17.77% and 18.07% in the amount of galactogen measured in the infected snails (79.60 $\pm$ 0.31 and 93.55 $\pm$ 0.62 mg of galactose/g of tissue, wet weight, respectively) in relation to the control group (67.59 $\pm$ 2.54 and 79.23 $\pm$ 1.86 mg of galactose/g of tissue, wet weight, respectively). However, 40 d.p.i. the amount of galactogen in the infected snails (74.12 $\pm$ 0.29 mg of galactose/g of tissue, wet weight) again showed a significant decrease of 7.09% compared to the control (79.78 $\pm$ 0.60 mg of galactose/g of tissue, wet weight) (Table 1).

Regression analysis revealed a strong positive relation for both groups. At 20 d.p.i., the galactogen content was higher in the infected snails, but then declined at 30 d.p.i., but the two groups studied followed the same pattern of variation in the galactogen content (Figure 1C).

The histological analysis revealed that in the uninfected snails the reproductive function was preserved, with active gametogenesis, evidencing male and female gamete cells at different stages of development (Figure 2A). However, because of infection by *P. bragai* a significant reduction in the oocytes number in the ovotestes of infected *S. octona*, from 30 d.p.i. occurred (Figure 2B). In addition, the few oocytes observed in the infected snails presented irregular and granular cytoplasm and nucleus in apoptotic process.

4. Discussion

Maldonado (1945) first observed that *S. octona* was able to host *P. bragai* allowing its larval intramolluscan development. Keller and Araújo (1992) reported that this

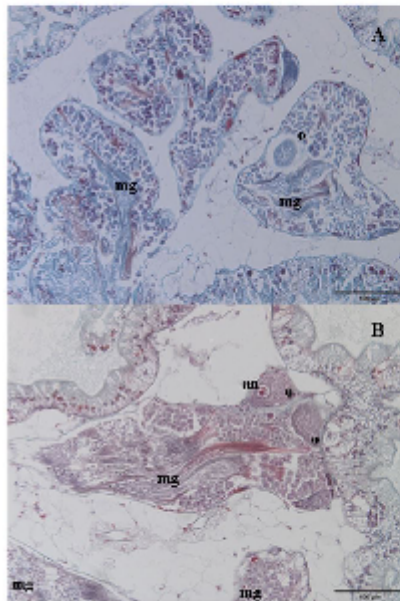


Figure 2. Histological analysis of gonadal tissue of the terrestrial snail *Subulinia octona*. A) Uninfected snail, showing numerous male gametes (mg) in different stages of maturation and an oocyte (o). Scale bar = 100 µm. B) Snail infected by *Paratamaisia bragai* trematode showing numerous male gametes (mg) at different stages of maturation and two oocytes (o) with granular cytoplasm and nucleus in the process of apoptosis (an). Scale bar = 100 µm. Gomori's trichrome stain.

digenetic trematode did not develop in experimentally infected *S. octona*. Brandolini et al. (1997) showed that *S. octona* can act as an intermediate host of *P. bragai* under laboratory conditions and evaluated the effect of parasitism on some reproductive and biological aspects. However, in the present study, the results found by previous authors were complemented and the reproductive changes observed were associated with the metabolic alterations in host during the pre-patent period of parasite development.

The total number of eggs observed inside the parental snails was reduced because of the infection. It could also be evidenced an inversion of the oscillatory pattern in the egg production, no longer being a positive relation, whereby infected snails began their reproductive activity with a lower investment, followed by an increase in the egg production in relation to the uninfected snails. Sullivan et al. (1985) observed a similar phenomenon in other parasite-host systems, called fecundity compensation. In the present study, this compensation was only observed

at 20 d.p.i., when then the number of eggs produced was slightly higher (5.6%) in the group of infected snails.

Notably, this reproductive effort increased at 20 d.p.i. in infected snails did not lead to an increase in reproductive success, since the number of eggs hatched was lower than that of control snails, even though there was a larger energy investment in the reproductive process, with an increase of almost 18% in the galactogen content in infected snails.

Despite the lower initial investment, evidenced by the reversal of the oscillating pattern in egg production, uninfected snails could not maintain the normal pattern of their reproductive biology, as observed in the uninfected animals. Hatchability maintained the same pattern in both groups, but infected snails, in average, had a lower hatching rate than the uninfected specimens (control).

Interestingly, the galactogen content was higher in the albumen gland of infected snails than in uninfected ones, evidencing that the parasite castration process observed in the *S. octona/P. bragai* system is not a nutritional type castration (Baudoin, 1975). In conclusion, even with an increased energy investment, there was failure of the compensatory processes, resulting in an effective castration process in parasitized snails.

The interference of larval digenetic trematode in the reproduction of the snail first intermediate host is a common phenomenon (Pinheiro and Amato, 1995). The term parasitic castration is used to refer to an interruption or a decrease in the reproductive activity of snails in response to parasitic infections. This can be caused by direct mechanisms, such as destruction of gonadal tissues of the host during intramolluscan larval development of the parasite, or indirectly, due interferences with neuroendocrine system (NES) or absorption, by the parasite, of circulating nutrients in the hemolymph required for the development and maintenance of the snail (Baudoin, 1975; Tunholi-Alves et al., 2011).

The results obtained in the present study showed that the presence of developing larvae of *P. bragai* caused a decrease in the reproductive activity of infected *S. octona*, mainly during the first 10 days of infection, when all the analyzed parameters presented a reduction in comparison with the control group. Brandolini and Amato (2006), monitoring the intramolluscan development of *P. bragai* in *S. octona*, observed that six, eight and ten days after infection, it was possible to observe first generation sporocysts near the wall of the intestine and spreading towards the digestive gland. The germinative capacity of the first generation sporocyst depends on the space availability in the host's body (Maldonado, 1945). Those authors also observed the presence of second generation sporocysts after 15 days of infection and after 32 days the presence of fully developed cercariae and metacercariae in the digestive gland.

The increase of the galactogen content during the 20 to 30 d.p.i. period indicates that the snails, to some extent, maintained the biosynthetic pathway of this polysaccharide near to normal value. In spite of the eggs production and high amount of galactogen, many embryos

were not viable, as evidenced by the reduced hatching rate of infected snails.

The histopathological analysis showed that the castration process observed in the system *P. bragai*/*S. octona*, is not nutritional, contrary to what Brandolini et al. (1997) reported. Brandolini and Amato (2006) reported that castration in this host-parasite system is mechanical, due to the presence of metacercariae in the ovotestis of snails. We did not identify the presence of larval trematodes in the ovotestis, and gonadal tissues did not show morphological or structural alterations due to mechanical pressure. Additionally, absence of development or reduced numbers of oocytes in infected hosts was observed.

So, the similar amount of galactogen and the absence of developing larvae in gonadal tissues indicate the existence of an endocrine process, leading to inhibition of oocyte maturation, probably due to the presence of excretory and secretory products (E/S) released by the larvae during their intramolluscan development. By the action of these E/S products, the parasite may modulate the NES, altering the development and functioning of the female reproductive system.

Generally, the literature about the digenetic trematode *P. bragai* is related to the occurrence of this parasite in different bird species that can act as definitive hosts. Few studies have sought to elucidate the relation of the parasite with its intermediate hosts *S. octona* and *L. unilamellata*. The obligatory character of the use of a mollusk as an intermediate host and the high specificity of the interaction between larval trematode and their mollusk host, makes this point of the parasite life cycle an excellent target for integrated disease control programs. Although to establish more effective control programs it is required a deep knowledge about the host-parasite interactions. By this reason, the present study, by the first time, bring some light to physiological aspects of the interaction *P. bragai*-*S. octona*, focusing the reproductive features of this system.

Acknowledgements

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – grant number 303248/2018-1), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ – grant number E-26/203.004/2016) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brazil (CAPES) - finance code 001. V. M. Tunholi-Alves was post doctoral fellow, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), process number E-26/202.866/2016.

References

ARAÚJO, J.L.B. and BESSA, E.C.A., 1993. Moluscos de importância econômica no Brasil. II. Subulinidae, *Subulina octona* (Brugniere) (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata, Stylommatophora). *Revista*

Brasileira de Zoologia, vol. 10, no. 3, pp. 489-497. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-81751993000300016>.

BAUDOUIN, M., 1975. Host castration as a parasitic strategy. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, vol. 29, no. 2, pp. 335-352. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1558-5646.1975.tb00213.x>. PMID:28555867.

BESSA, E.C.A. and ARAÚJO, J.L.B., 1995. Oviposição, tamanho de ovos e medida do comprimento da concha em diferentes fases do desenvolvimento de *Subulina octona* (Brugniere) (Pulmonata, Subulinidae) em condições de laboratório. *Revista Brasileira de Zoologia*, vol. 12, no. 3, pp. 647-654. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-81751995000300020>.

BOFFI, A.V., 1979. *Moluscos brasileiros de interesse médico e econômico*. São Paulo: Hucitec, 182 p.

BRANDOLINI, S.V.P.B. and AMATO, S.B., 2006. Desenvolvimento larval de *Paratanaisia bragai* (Santos) (Digenea, Encyrtidae) sob condições experimentais. *Revista Brasileira de Zoologia*, vol. 23, no. 4, pp. 1097-1100. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-81752006000400017>.

BRANDOLINI, S.V.P.B., AMATO, S.B. and PEREIRA, A.A., 1997. Relacionamento de *Tanaisia bragai* (Digenea, Encyrtidae) e seu hospedeiro intermediário, *Subulina octona* (Gastropoda, Subulinidae) sob condições experimentais. *Parasitologia al Dia*, vol. 21, no. 3-4, pp. 109-113. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-07201997000300008>.

BRENER, B., TORTELLI, R., MENEZES, R.C., MUNIZ-PEREIRA, L.C. and PINTO, R.M., 2006. Prevalence and pathology of the nematode *Heterakis gallinarum*, the trematode *Paratanaisia bragai*, and the protozoan *Histomonas meleagridis* in the turkey, *Meleagris gallopavo*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 101, no. 6, pp. 677-681. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762006000600017>. PMID:17072483.

CARNEIRO, J.R., LUSTOSA, E.S., PEREIRA, E., CARVALHO, E.D. and NAPOLI, M.A., 1975. Incidência de ecto e endoparasitos de pombos (*Columba livia domestica*) em Goiânia. *Revista de Patologia Tropical*, vol. 4, no. 1, pp. 39-41.

CREWS, A.E. and YOSHINO, T.P., 1990. Influence of larval schistosomes on polysaccharide synthesis in albumin glands of *Biomphalaria glabrata*. *Parasitology*, vol. 101, no. Pt 3, pp. 351-359. <http://dx.doi.org/10.1017/S0033182000060546>. PMID:2092292.

DE CARLI, G.A., 1994. *Diagnóstico laboratorial das parasitoses humanas: métodos e técnicas*. Rio de Janeiro: MEDSI Editora Médica e Científica.

DURÇO, E., MATOS, F., PILATE, V., CORTEZ, L., BESSA, E.A., SILVA, L., 2013. Estudo comportamental comparado entre *Subulina octona* (Brugniere, 1789) e *Leptinaria unilamellata* (d'Orbigny, 1835) (Mollusca: Subulinidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, vol. 15, no. 1,2,3, pp. 97-105.

FARO, M.J., PERAZZINI, M., CORRÊA, L.S., MELLO-SILVA, C.C., PINHEIRO, J., MOTA, E.M., SOUZA, S., ANDRADE, Z. and MALDONADO JUNIOR, A., 2013. Biological, biochemical and histopathological features related to parasitic castration of *Biomphalaria glabrata* infected by *Schistosoma mansoni*. *Experimental Parasitology*, vol. 134, no. 2, pp. 228-234. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2013.03.020>. PMID:23541880.

FERNANDES, M.C., 1949. *Métodos escolhidos de técnicas microscópicas*. 2. ed. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional.

GOMOT, P., GOMOT, L. and GRIFFOND, B., 1989. Evidence for a light compensation of the inhibition of reproduction by low

- temperatures in the snail *Helix aspersa*. Ovotestis and albumen gland responsiveness to different conditions of photoperiods and temperatures. *Biology of Reproduction*, vol. 40, no. 6, pp. 1237-1245. <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod40.6.1237>. PMID:2775817.
- GOMES, D.C., MENEZES, R.C., TORTELLY, R. and PINTO, R.M., 2005. Pathology and first occurrence of the kidney trematode *Paratanaisia bragai* (Santos, 1934) Freitas, 1959 (Digenea: Eucotylidae) in *Phasianus colchicus* L., 1758, from Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 100, no. 3, pp. 285-288. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762005000300013>. PMID:16113870.
- KANEV, I., RADEV, V. and FRIED, B., 2002. Family Eucotylidae Cohn, 1904. In: D.I. GIBSON, A. JONES, R.A. BRAY, eds. *Keys to Trematoda*. Wallingford: CABI Publishing, 321 p. <http://dx.doi.org/10.1079/9780851995472.0147>.
- KELLER, G.G. and ARAÚJO, J.L.B., 1992. Ciclo evolutivo de *Paratanaisia bragai* (Santos, 1934) (Trematoda, Eucotylidae) como novo hospedeiro intermediário no Brasil: *Leptinaria unilamellata* (D'Orbigny, 1835) (Gastropoda, Pulmonata, Subulinidae) em condições de laboratório. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, vol. 1, no. 2, pp. 89-92.
- KUMAR, B.M., TAIBUR, R., SUSHANTA, G. and SAIDUL, I., 2009. On the incidence and pathology of *Paratanaisia bragai* dos Santos, 1934 (Freitas, 1959) infection in domestic pigeon (*Columba livia*). *Veterinary Parasitology*, vol. 23, no. 2, pp. 159-161.
- LUPPI, M.M., DE MELO, A.L., MOTTA, R.O., MALTA, M.C., GARDINER, C.H. and SANTOS, R.L., 2007. Granulomatous nephritis in psittacines associated with parasitism by the trematode *Paratanaisia* spp. *Veterinary Parasitology*, vol. 146, no. 3-4, pp. 363-366. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.03.011>. PMID:17418949.
- MALDONADO, J.F., 1945. The life cycle of *Ilmnerlantia bragai*, Santos, 1934 (Eucotylidae), a kidney fluke of domestic pigeons. *The Journal of Parasitology*, vol. 31, no. 5, pp. 306-314. <http://dx.doi.org/10.2307/3273085>.
- MINCHELLA, D.J., 1985. Host-history variation in response to parasitism. *Parasitology*, vol. 90, no. 1, pp. 205-216. <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182000049143>.
- MENEZES, R.C., MATTOS JUNIOR, D.G., TORTELLY, R., MUNIZ-PEREIRA, L.C., PINTO, R.M. and GOMES, D.C., 2001. Trematodes of free range reared guinea fowls (*Numida meleagris* Linnaeus, 1758) in state of Rio de Janeiro, Brazil: morphology and pathology. *Avian Pathology*, vol. 30, no. 3, pp. 209-214. <http://dx.doi.org/10.1080/03079450124448>. PMID:19184902.
- PINHEIRO, J. and AMATO, S.B., 1995. *Eurytremia coelomaticum*: influence of the infection on the reproduction and nucleic acids contents in the albumen gland and ovotestis of *Bradybaena similis*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 90, no. 5, pp. 635-638. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761995000500019>. PMID:8569479.
- PINHEIRO, J. and GOMES, E.M., 1994. A method for glycogen determination in molluscs. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, vol. 37, no. 3, pp. 569-576.
- PINTO, R.M., MENEZES, R.C. and TORTELLY, R., 2004. Systematic and pathology study of *Paratanaisia bragai* (Santos, 1934) Freitas, 1959 (Digenea, Eucotylidae) infestation in ruddy ground dove *Columbina talpacoti* (Temminck, 1811). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, vol. 56, no. 4, pp. 472-479. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-0932004000400008>.
- SANTI, M., ANDRE, M.R., HOPPE, E.G.L. and WERTHER, K., 2017. Occurrence of *Paratanaisia confusa* Freitas, 1951 in free-living guira cuckoo (*Guiraca guiraca*, Cuculiformes: crotophagidae). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, vol. 26, no. 2, pp. 248-251. <http://dx.doi.org/10.1590/s1984-29612017014>. PMID:28746453.
- SANTI, M., COUTO, C. and WERTHER, K., 2018. Occurrence of *Paratanaisia* spp. Freitas, 1951 in a domiciled cockatiel (*Nymphicus hollandicus*, Psittaciformes: cakatidae). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, vol. 27, no. 4, pp. 575-578. <http://dx.doi.org/10.1590/s1984-296120180034>. PMID:29846439.
- SANTOS, V., 1934. Monostomose renal de aves doméstica. *Revista do Departamento Nacional da Produção Animal*, vol. 1, no. 1, pp. 203-215.
- SILVA, T.M., PAVAN, L.F., GUIMARÃES-OKAMOTO, P.T.C., MILBRADT, E.L., ANDREATTI FILHO, R.L., SILVA, R.J. and OKAMOTO, A.S., 2016. First record of *Paratanaisia bragai* (Digenea: Eucotylidae) in blue and gold macaw (*Ara ararauna*). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, vol. 25, no. 1, pp. 112-115. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612016001>. PMID:26982561.
- SULLIVAN, J.T., CHENG, T.C. and HOWLAND, K.H., 1985. Studies on parasitic castration: castration of *Ilyanassa obsoleta* (Mollusca: Gastropoda) by several marine Trematodes. *Transactions of the American Microscopical Society*, vol. 104, no. 2, pp. 154-171. <http://dx.doi.org/10.2307/3226423>.
- SUMNER, J.B., 1924. A method for colorimetric determination for phosphorus. *Science*, vol. 2601, no. 100, pp. 413-414.
- TARODA, A., DEBARROS, L.D., ZULPO, D.L., DACUNHA, I.A., PAIVA, M.C., SAMM, A.S., DOS SANTOS, J.R., YAMAMURA, M.H., VIDOTTO, O. and GARCIA, J.L., 2013. Occurrence of gastrointestinal and renal helminths in *Zenaidura macroura* (Des Murs, 1847) trap-captured from Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, vol. 22, no. 3, pp. 415-419. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612013000300016>. PMID:24142175.
- TAVELA, A.O., CARRETTA JUNIOR, M., OLIVEIRA, A.R., CARNEIRO, F.T., SILVA, V.H.D., BRAGA, F.R., PEIXOTO, J.V., CARVALHO, G.D., ARAÚJO, J.V. and PAULA, T.A.R., 2014. Parasitism by *Paratanaisia bragai* (Digenea, Eucotylidae) in common waxbill (*Estrilda astrild*). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, vol. 66, no. 4, pp. 1276-1280. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-7136>.
- TEODORO, T.G.W., OLIVEIRA JUNIOR, I.M., LIMA, H.C., REIS, M.O., MIRANDA, J.L., FAVORETTO, S.M., PINTO, H.A., LACRETA JUNIOR, A.C.C., WOUTERS, A.T.B. and VARASCHIN, M.S., 2018. *Psittacara leucophthalmus* (Aves: Psittacidae) como um novo hospedeiro de *Paratanaisia bragai* (Trematoda: Eucotylidae) no Brasil: achados clínicos e patológicos: relato de caso. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, vol. 70, no. 5, pp. 1569-1576. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-10300>.
- TOLOSA, E.M.C., RODRIGUES, C.J., BEHMER, O.A. and FREITAS-NETO, A.G., 2003. *Manual de técnicas para histologia normal e patológica*. São Paulo: Manole, pp. 331.
- TUNHOLI, V.M., LUSTRINO, D., TUNHOLI-ALVES, V.M., MELLO-SILVA, C.C.C., MALDONADO JUNIOR, A., RODRIGUES, M.L.A. and PINHEIRO, J., 2011. Changes in the reproductive biology of *Biomphalaria glabrata* infected with different doses of *Echinostoma paraensei* miracidia. *Journal of*

Invertebrate Pathology, vol. 106, no. 2, pp. 192-195. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2010.09.006>. PMID:20850448.

TUNHOLI-ALVES, V.M., TUNHOLI, V.M., LUSTRINO, D., AMARAL, L.S., THIENGO, S.C. and PINHEIRO, J., 2011. Changes in the reproductive biology of *Biomphalaria glabrata* experimentally infected with the nematode *Angiostrongylus cantonensis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 108, no. 3, pp. 220-223. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2011.08.009>. PMID:21925506.

XAVIER, V.B., OLIVEIRA-MENEZES, A., SANTOS, M.A.J., AMATO, S.B., TORRES, E.J.L., PINHEIRO, J.S. and BRANDOLINI, S.V.P.B., 2015. Histopathological changes in the kidneys of vertebrate hosts infected naturally and experimentally with *Paratanaisia bragai* (Trematoda, Digenea). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, vol. 24, no. 2, pp. 241-246. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612015017>. PMID:26154968.

YAMAGUTI, S., 1958. *Systema Helminthum. The Digenetic Trematodes of Vertebrates*. New York: Interscience Publishers, 979 p.