

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

MARIA LARISSA BITENCOURT VIDAL

ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E REPRODUTIVAS EM *Pseudosuccinea columella* (Mollusca: Gastropoda) APÓS INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *Heterorhabditis baujardi* (Rhabditida: Heterorhabditidae) cepa LPP7

ALEGRE-ES

2020

MARIA LARISSA BITENCOURT VIDAL

ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E REPRODUTIVAS EM *Pseudosuccinea columella* (Mollusca: Gastropoda) APÓS INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *Heterorhabditis baujardi* (Rhabditida: Heterorhabditidae) cepa LPP7

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

Orientadora: Profa. Dra. Isabella Vilhena Freire Martins

Co-orientador: Prof. Dr. Victor Menezes Tunholi Alves

ALEGRE-ES

2020

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

V649a Vidal, Maria Larissa Bitencourt, 1994-
ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E REPRODUTIVAS EM
Pseudosuccinea columella (Mollusca: Gastropoda) APÓS
INFECCÃO EXPERIMENTAL POR *Heterorhabditis baujardi*
(Rhabditida: Heterorhabditidae) cepa LPP7 / Maria Larissa
Bitencourt Vidal. - 2020.
57 f. : il.

Orientadora: Isabella Vilhena Freire Martins.

Coorientador: Victor Menezes Tunholi Alves.

Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) -
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências
Agrárias e Engenharias.

1. controle biológico. 2. *Lymnaea* sp.. 3. nematoides
entomopatogênicos (NEP's). I. Martins, Isabella Vilhena
Freire. II. Tunholi Alves, Victor Menezes. III. Universidade
Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e
Engenharias. IV. Título.

CDU: 619

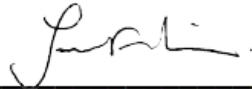
MARIA LARISSA BITENCOURT VIDAL

ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E REPRODUTIVAS EM *Pseudosuccinea columella* (Mollusca: Gastropoda) APÓS INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *Heterorhabditis baujardi* (Rhabditida: Heterorhabditidae) cepa LPP7

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

Aprovado em 17 de fevereiro de 2020.

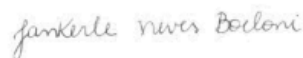
COMISSÃO EXAMINADORA



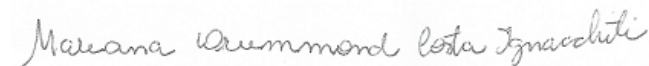
Prof^a. Dr^a. Isabella Vilhena Freire Martins
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora



Prof. Dr. Victor Menezes Tunholi Alves
Universidade Federal do Espírito Santo
Co-orientador



Prof^a. Dr^a. Jankerle Neves Boeloni
Universidade Federal do Espírito Santo



Prof^a. Dr^a. Mariana Drummond Costa Ignacchiti
Universidade Federal do Espírito Santo

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por todo cuidado e direcionamento em minha vida, ao meu amor Abraão pela parceria e apoio, não medindo esforços e batalhando junto comigo para conquistar nossos objetivos, a minha família por compreender minha ausência, principalmente minha mãe Nalva e aos meus cunhados Nayara e Juninho por todo apoio e parceria, aos amigos que fiz e família Whiskas de Alegre, que fizeram com que fosse mais fácil viver longe de casa.

Agradeço a minha orientadora Isabella e meu coorientador Victor por todos os ensinamentos e inspirações, aos meus professores colaboradores Jankerle, Louisiane, Graziela e Rafael, com certeza sempre farão parte de minhas lembranças, pelos conselhos e oportunidades.

A todos os meus colegas de laboratório que contribuíram tanto para que tudo desse certo, principalmente André, Ygor e Natânia que fizeram parte desse trabalho junto comigo. Agradeço a Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) por ter sido minha casa durante esses sete anos e a oportunidade de ter tido acesso ao ensino público de qualidade e ter me feito a profissional que sou e a Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES), pela contribuição financeira. Ao Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins (LUCCAR) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) pela contribuição com a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento. 001. "

RESUMO

VIDAL, MARIA LARISSA BITENCOURT. **ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E REPRODUTIVAS EM *Pseudosuccinea columella* (Mollusca: Gastropoda) APÓS INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *Heterorhabditis baujardi* (Rhabditida: Heterorhabditidae) cepa LPP7**, 2020. 57p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Centro de Ciências Agrárias e Engenharias – CCAE, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2020.

O molusco *Pseudosuccinea columella* representa um hospedeiro intermediário do trematoda *Fasciola hepatica*, corroborando para a distribuição da doença. Neste sentido, inúmeras metodologias voltadas para o controle de moluscos hospedeiros têm sido desenvolvidas como alternativa de prevenção e controle dessa e de outras parasitoses. Este estudo objetivou sob condições laboratoriais avaliar a susceptibilidade de *P. columella* a juvenis infectantes do nematoide *Heterorhabditis baujardi* LPP7. Alterações biológicas, bioquímicas e histopatológicas foram verificadas semanalmente ao longo de três semanas entre caramujos expostos ao nematoide, submetidos a 24h de exposição com 75 JI/mL quando comparado àqueles não expostos. Dentre as alterações, a exposição aos nematoides entomopatogênicos (NEPs) demonstrou redução do metabolismo de glicose e glicogênio dos moluscos expostos na 1ª semana e 2ª semana, e proteínas totais apenas na 1ª semana, induzindo concomitantemente aumento nas atividades hemolinfáticas das aminotransferases (ALT e AST) e da lactato desidrogenase, bem como acúmulo sérico de ácido úrico, na 1ª e 2ª semana. Em relação aos parâmetros reprodutivos, alterações foram registradas na primeira semana e estabilizou nas próximas semanas pós-exposição, sendo estas caracterizadas por uma redução significativa na produção de ovos e de massas ovíferas. Além disso, análises histopatológicas realizadas em moluscos expostos evidenciaram necrose celular na primeira semana, reações inflamatórias teciduais na 1ª e 2ª e degeneração na 3ª semana. Na microscopia eletrônica de varredura, a glândula albuminosa apresentou proliferação de tecido conjuntivo fibroso na 3ª semana nos moluscos expostos quando comparado aos não expostos. Os resultados indicaram que *P. columella* foi susceptível ao *H. baujardi* LPP7, demonstrando alterações fisiológicas, reprodutivas e teciduais dos moluscos. A exposição reduziu níveis energéticos, aumentou enzimas relacionadas a danos teciduais e acúmulo de compostos nitrogenados, induziu o fenômeno de castração

precoce e temporária em *P. columella* e lesões nos tecidos, demonstrando notório potencial no controle biológico deste gastrópode.

Palavras-chave: controle biológico. *Lymnaea* sp. Nematoides entomopatogênicos (NEPs).

ABSTRACT

VIDAL, MARIA LARISSA BITENCOURT. **PHYSIOLOGICAL AND REPRODUCTIVE CHANGES IN *Pseudosuccinea columella* (Mollusca: Gastropoda) AFTER EXPERIMENTAL INFECTION BY *Heterorhabditis baujardi* (Rhabditida: Heterorhabditidae) strain LPP7**, 2020. 57p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Centro de Ciências Agrárias e Engenharias – CCAE, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2020.

The mollusc *Pseudosuccinea columella* represents an intermediate host of the trematode *Fasciola hepatica*, corroborating the distribution of the disease. In this sense, numerous methodologies aimed at the control of host mollusks have been developed as an alternative for the prevention and control of this and other parasites. This study aimed, under laboratory conditions, to evaluate the susceptibility of *P. columella* to juvenile infective of the nematode *Heterorhabditis baujardi* strain LPP7. Biological, biochemical and histopathological changes were verified weekly over three weeks among snails exposed to the nematode, submitted to 24 hours of exposure with 75 IJ/ mL when compared to those not exposed. Among the changes, exposure to entomopathogenic nematodes (NEPs) demonstrated a reduction in the glucose and glycogen metabolism of mollusks exposed in the 1st week and 2nd week, and total proteins only in the 1st week, concomitantly inducing an increase in the hemolymphatic activities of the aminotransferases (ALT and AST) and lactate dehydrogenase, as well as serum uric acid accumulation, in the 1st and 2nd weeks. Regarding reproductive parameters, changes were recorded in the first week and stabilized in the following weeks after exposure, which are characterized by a significant reduction in the production of eggs and ovigerous masses. In addition, histopathological analyzes performed on exposed molluscs showed cell necrosis in the first week, inflammatory tissue reactions in the 1st and 2nd and degeneration in the 3rd week. In scanning electron microscopy, the albuminous gland showed proliferation of fibrous connective tissue in the 3rd week in exposed molluscs when compared to unexposed mollusks. The results indicated that *P. columella* was susceptible to *H. baujardi* strain LPP7, showing physiological, reproductive and tissue changes of the mollusks. The exposure

reduced energy levels, increased enzymes related to tissue damage and accumulation of nitrogen compounds, induced the phenomenon of early and temporary castration in *P. columella* and tissue damage, demonstrating a notable potential in the biological control of this gastropod.

Key-words: biological control. entomopathogenic nematodes (EPN's). *Lymnaea* sp.

LISTA DE FIGURAS

| Figura | Página |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| <p>Figura 1. Morfologia externa de <i>Pseudosuccinea columella</i>, evidenciando sua concha, seus tentáculos em formato triangular com achatamento e seus olhos compondo o centro da base dos tentáculos.....</p> | 15 |
| <p>Figura 2. Fotomicrografia da morfologia dos órgãos que compõe a massa visceral do molusco <i>Pseudosuccinea columella</i> mediante coloração Hematoxilina-Eosina, evidenciando pela letra A- massa cefalopediosa; B- manto; C- glândula albuminosa; D e E- glândula digestiva; F- ovotestis.....</p> | 18 |
| <p>Figura 3. Esquema do ciclo de vida dos nematoides entomopatogênicos do gênero <i>Heterorhabditis</i> dentro de um inseto.....</p> | 22 |
| <p>Figura 4. Fluxograma dos principais processos ocorridos durante os 21 dias de experimentação, iniciado pela seleção e obtenção dos materiais utilizados (moluscos e nematoides entomopatogênicos), seguido da exposição experimental de <i>Pseudosuccinea columella</i> a <i>Heterorhabditis baujardi</i> LPP7 e um grupo controle, posteriormente acondicionados em aquários, separados pelos grupos (controle e exposto), findado pelas avaliações para verificar os mecanismos que levaram as alterações nos indivíduos expostos.....</p> | 27 |
| <p>Figura 5- Fotomicrografia da histopatologia de <i>Pseudosuccinea columella</i> em coloração H-E, evidenciando o Grupo Controle (A,B,C, G, H e I) e Grupo Exposto (D,E,F, J,K e L) sendo o manto sem alterações (A e B) e com áreas de necrose (D e E), glândula albuminosa sem alterações (C e F), ovotestis demonstrando diferença na quantidade de células femininas (G e J) e glândula digestiva normal (H, I) e com vacúolos (K) e infiltrado inflamatório e cisto (L). Evidenciando área de necrose (seta preta); espermatogônias (seta azul), ovogônia (seta vermelha) e vacuolização (seta amarela).....</p> | 37 |
| <p>Figura 6. Fotografia ultraestrutural de <i>Pseudosuccinea columella</i> em microscopia eletrônica de varredura, evidenciando a linha à esquerda o controle e a direita o exposto a <i>Heterorhabditis baujardi</i> LPP7 nas três semanas de avaliação, demonstrando estrutura geral (A e B), glândula albuminosa normal (C) e com fibras dispostas (D) e glândula digestiva normal (E e G) e apresentando lesão e fibras (F) e (H).....</p> | 39 |

LISTA DE SIGLAS E/OU ABREVIATURAS

ALT – Alanina Aminotransferase

AST – Aspartato Aminotransferase

F. hepatica – *Fasciola hepatica*

GA – Glândula Albuminosa

GC – Grupo Controle

GD – Glândula Digestiva

GI – Grupo Infectado

H. baujardi – *Heterorhabditis baujardi*

L. columella – *Lymnaea columella*

LD – Lactato desidrogenase

MC – Massa Cefalopediosa

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

NEPs – Nematoides entomopatogênicos

PBS – Phosphate buffered saline/ Tampão fosfato salino

PTT- Proteína Total

Sumário

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 14 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 16 |
| 2.1 <i>Fasciola hepatica</i> e fasciolose no Brasil | 16 |
| 2.1.1 Principal Hospedeiro Intermediário de <i>Fasciola hepatica</i> | 17 |
| 2.1.2 Formas de controle | 20 |
| 2.2 Nematoides entomopatogênicos | 22 |
| 2.2.1 Ciclo biológico dos NEPs | 22 |
| 2.3. Nematoides entomopatogênicos como controle biológico de parasitos | 24 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 27 |
| 3.1 Obtenção de <i>Pseudosuccinea columella</i> | 27 |
| 3.2 Obtenção de nematoides entomopatogênicos <i>Heterorhabditis baujardi</i> LPP7 .. | 27 |
| 3.3 Exposição experimental de <i>Pseudosuccinea columella</i> a <i>Heterorhabditis baujardi</i> LPP7 | 28 |
| 3.4 Análises Bioquímicas | 29 |
| 3.4.1 Glicogênio e glicose | 30 |
| 3.4.2 Proteína total (PTT)..... | 30 |
| 3.4.3 Lactato desidrogenase (LDH)..... | 31 |
| 3.4.4 ALT e AST | 31 |
| 3.4.5 Ácido úrico e ureia..... | 32 |
| 3.5 Avaliação da taxa de mortalidade e da biologia reprodutiva de <i>P. columella</i> pós-exposição a <i>H. baujardi</i> LPP7 | 32 |
| 3.6 Avaliação das alterações histológicas de <i>Pseudosuccinea columella</i> | 33 |
| 3.7 Microscopia eletrônica de Varredura (MEV) | 33 |
| 3.8 Análise dos dados | 34 |
| 4. RESULTADOS | 35 |
| 4.1. Alterações bioquímicas em <i>P. columella</i> expostas a <i>H. baujardi</i> LPP7 | 35 |
| 4.2. Avaliação da taxa de mortalidade e da biologia reprodutiva de <i>P. columella</i> expostas a <i>H. baujardi</i> LPP7 | 37 |
| 4.3. Alterações histológicas de <i>P. columella</i> expostas a <i>H. baujardi</i> LPP7 | 37 |
| 4.4. Microscopia eletrônica | 40 |

| | | |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5. | DISCUSSÃO | 42 |
| 5.1 | Alterações bioquímicas em <i>P. columella</i> expostas a <i>H. baujardi</i> LPP7 | 42 |
| 5.2 | Avaliação da taxa de mortalidade e da biologia reprodutiva de <i>P. columella</i> expostas a <i>H. baujardi</i> LPP7 | 45 |
| 5.3 | Alterações histopatológicas em <i>P. columella</i> expostas a <i>H. baujardi</i> LPP7 | 47 |
| 5.4 | Microscopia eletrônica | 48 |
| 6. | CONCLUSÕES | 49 |
| 7. | REFERÊNCIAS | 50 |

1. INTRODUÇÃO

A enfermidade distribuída mundialmente, conhecida como fasciolose, é uma doença que gera grandes perdas econômicas devido as alterações sistêmicas que causam significativas perdas produtivas, especialmente na bovinocultura e ovinocultura, além de se tratar de uma zoonose fomentando importantes desordens clínicas no homem (JACOBS *et al.*, 2015).

O molusco *Pseudosuccinea columella* (*Lymnaea columella*) enquadra-se como principal espécie que atua como hospedeiro intermediário de *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) no Brasil (FERNANDEZ *et al.*, 2012).

Os métodos de controle da doença envolvem ações que visam diminuir a população de hospedeiros intermediários no ambiente ou realizar o tratamento dos hospedeiros definitivos, porém estas ações têm sido extremamente dificultadas em decorrência da impossibilidade no uso de moluscidas e pela crescente resistência parasitária encontrada entre as populações de *Fasciola* spp. (LUQUE, 2014; BOWMAN, 2014; KELLEY *et al.*, 2016).

Segundo Ministério da Saúde - Brasil (2008), desde a década de 50 têm sido realizados estudos de controle biológico em moluscos hospedeiros, onde várias espécies de animais têm sido utilizadas como “controladoras” dessas populações, sem causar danos ao ambiente. Os nematoides de vida livre desempenham condições de relações e associações como vetores e como controle biológico, acarretando prejuízos aos hospedeiros (KAYA; STOCK, 1997; RUPPERT; FOX; BARNES, 2005).

Em adição, substâncias facilmente biodegradáveis obtidas a partir de plantas são procuradas como ferramentas no controle alternativo de gastrópodes, aumentando o interesse envolvendo produtos naturais (VIDAL *et al.*, 2018a).

Tunholi *et al.* (2014) demonstraram a patogenicidade de *Heterorhabditis indica* LPP1 em *Bradybaena similaris*. Segundo tais autores, a infecção pelo Nematóide Entomopatogênico (NEP) oportunizou relevantes alterações metabólicas no molusco hospedeiro, corroborando para obtenção de uma significativa taxa de mortalidade nesta população logo após a primeira semana de exposição. Posteriormente, Tunholi *et al.* (2017a) observaram que *H. baujardi* LPP7 afetou diretamente a biologia de *Lymnaea columella*, sendo responsável por uma taxa média de mortalidade de 66%,

alterações reprodutivas e fisiológicas nestes limineídeos. Estes estudos sugerem a utilização destes nematoides como potencial alternativa no controle biológico destes gastrópodes.

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da infecção de *Heterorhabditis baujardi* LPP7 em *Pseudosuccinea columella*, mediante a caracterização de alguns padrões fisiológicos, biológicos e reprodutivos dos moluscos hospedeiros intermediários da fasciolose.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Fasciola hepatica* e fasciolose no Brasil

O trematoda *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) é responsável por parasitar animais domésticos e selvagens no Brasil e apresenta altas taxas de morbidade de animais afetados. A doença é relevante na produção animal, principalmente em ruminantes e compreende uma zoonose, afetando diretamente a saúde pública (ALVES *et al.*, 2011).

A efetiva infecção da fasciolose depende de condições climáticas favoráveis, da existência de hospedeiro intermediário e de hospedeiros definitivos parasitados (MARQUES; SCROFERNEKER, 2003). As condições do ambiente influenciam na presença do hospedeiro intermediário, estando isso relacionado com a variação regional e anual da prevalência e incidência enzoótica da fasciolose (PILE *et al.*, 1998).

Outros fatores que também contribuem para a manutenção do molusco e disseminação da fasciolose são: a temperatura entre 10 a 25°C, a baixa altitude topográfica e a vasta hidrografia com presença de áreas alagadas e banhadas. Este conjunto de fatores é importante para o desenvolvimento de grandes quantidades de metacercárias, que são necessárias para o estabelecimento de altas taxas de infecção (ALEIXO *et al.*, 2015).

A distribuição de *F. hepatica* depende da presença de limneídeos que mostram-se susceptíveis e permissivos a infecção. No Brasil, a ocorrência do parasito está associada à presença de *Lymnaea columella* (Say, 1817), *L. viatrix* (Orbigny, 1835) e *L. cubensis* (Pfeiffer, 1839), sendo que *L. columella* apresenta maior distribuição geográfica, ocorrendo nas regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Norte do país, demonstrando por isso maior relevância epidemiológica (MATTOS *et al.*, 1997; MEDEIROS *et al.*, 2014). Apesar da importância epidemiológica da família Lymnaeidae, o conhecimento atual sobre a sua sistemática bem como o papel das espécies na transmissão da fasciolose ainda é insuficiente (CARVALHO, 2014).

A relação entre *F. hepatica* e limneídeos está de acordo com a susceptibilidade do hospedeiro e com a capacidade do parasito em reconhecer e evadir o sistema

interno de defesa do molusco, efetuado pelos hemócitos e fatores solúveis presentes na hemolinfa. Esta condição de relação parasito-hospedeiro mostra-se semelhante em interações de outras espécies de trematódeos (LOCKYER *et al.*, 2004; ADEMA; LOKER, 2015).

As condições epidemiológicas são os fatores que mais favorecem a prevalência da fasciolose no Brasil, o clima e formação de áreas alagadas permanentes ou periódicas são os principais exemplos. Estes fatores favorecem a presença do molusco hospedeiro e dos hospedeiros vertebrados, além disso, também contribuem para que ações e medidas de controle da doença sejam alcançadas, combatendo a infecção por meio de controle ambiental e/ou nos hospedeiros (ALEIXO *et al.*, 2015; MOLENTO *et al.*, 2018).

Furtado *et al.* (2015) descreveram que a ocorrência de *L. columella* em municípios endêmicos é preocupante, uma vez que estes moluscos são transmissores obrigatórios de trematódeos, e que há necessidade de intensificação das medidas de monitoramento e controle dos moluscos nas coleções hídricas, pelo evidente risco de dispersão populacional.

2.1.1 Principal Hospedeiro Intermediário de *Fasciola hepatica*

O agente *Pseudosuccinea columella* *syn* *Lymnaea columella* apresenta complexas descrições sobre sua taxonomia, com constantes modificações sendo relacionadas (CARVALHO, 2014). Sua classificação taxonômica foi desenvolvida a seguir:

Reino: Animalia

Filo: Mollusca

Classe: Gastropoda

Subclasse: Orthogastropoda

Ordem: Pulmonata

Família: Lymnaeidae (Rafinesque, 1815)

Subfamília: Lymnaeinae (Rafinesque, 1815)

Gênero-tipo: *Lymnaea* (Lamarck, 1799)

Gênero *Pseudosuccinea* (Baker, 1908)

Espécie-tipo: *P. columella* (Say, 1817).

De acordo com a morfologia geral, a família Lymnaeidae é caracterizada por exemplares que apresentam variações morfológicas. Os limneídeos têm por características (demonstrada pela figura 1) apresentar concha cônica alongada, apresentando voltas convexas, giros para a direita (dextrógira) e com abertura tendendo a oval-alongada ou ovoide que podem ocupar desde a metade até três quartos do comprimento total da concha (CARVALHO, 2014). Em adição, tais exemplares são constituídos por estruturas anexas, envolvidas por sua concha, que desenvolvem seu metabolismo e reprodução, delimitadas por um manto que recobre a massa cefalopediosa e rádula, perfazendo os recursos básicos do molusco. O manto é uma cavidade fina, ligada por uma única camada de células epiteliais, que reveste o corpo da concha organizado por células glandulares subepidérmicas (VIAJAYA; PRIYADARSINI, 2014). A massa cefalopediosa é a estrutura principal da região cefálica, tendo importante função sensorial e motora, apresentando olhos situados na base interna dos tentáculos, que se caracterizam por serem achatados e triangulares (CARVALHO, 2014).

Figura 1. Morfologia externa de *Pseudosuccinea columella*, evidenciando sua concha (seta amarela), seus tentáculos em formato triangular com achatamento (seta vermelha) e seus olhos compondo o centro da base dos tentáculos (seta azul).



Fonte: O autor.

Há também, a glândula hermafrodita denominada ovotestis, onde estão localizadas as células germinativas femininas e masculinas, sendo recoberta pela

glândula albuminosa. Tanto o ovotestis quanto a glândula albuminosa, localizam no polo apical, anexados e interligados por um lóbulo acessório da glândula digestiva, que se compõe por ácidos tubulares que ocupam grande parte da cavidade espiral da concha. A glândula digestiva apresenta epitélio escamoso constituído por células digestivas e secretoras com formato piramidal a cônico, podendo ser colunar e a lâmina própria apresenta constituída por tecido conjuntivo fibroso, onde sua principal função é a manutenção do metabolismo energético do hospedeiro (KANAPALA; ARASADA, 2013).

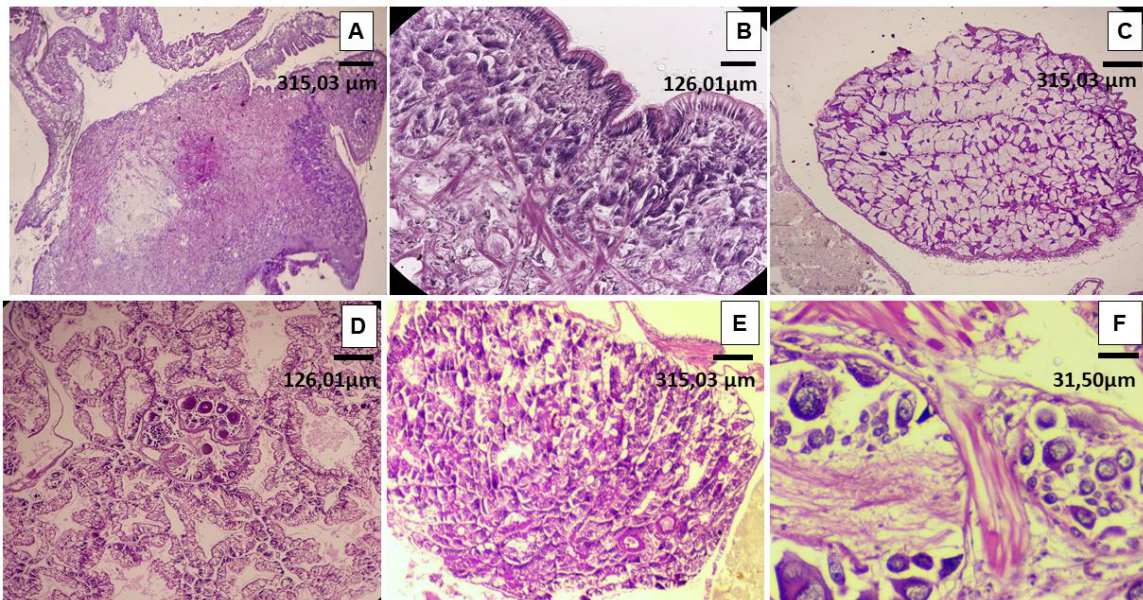
As células germinativas femininas são envolvidas a partir da secreção da glândula albuminosa, amadurecendo do ápice ao final da massa cefalopédica. Os gametas femininos e masculinos, se deslocam para a glândula de nidificação, onde a fertilização ocorre e são agrupados em massas denominadas massas ovígeras, constituídas por secreções translúcidas derivadas da glândula albuminosa, contendo os oócitos fertilizados, que a partir de um poro genital são depositados ao ambiente para que ocorra seu desenvolvimento. A embriogênese ocorre no ambiente e a liberação dos caramujos das massas ovígeras se fará entre 14 e 15 dias, dependendo do favorecimento das condições ambientais (TAIR-ABBACI *et al.*, 2017).

Tunholi-Alves e colaboradores (2013) descrevem fontes energéticas a partir de carboidratos, que são armazenadas nas células da glândula digestiva, massa cefalopédica e glândula albuminosa em gastrópodes, por meio de moléculas de glicogênio e galactogênio, respectivamente. Estas moléculas energéticas participam no desenvolvimento das massas ovígeras, sendo o galactogênio produzido exclusivamente pelos ácidos que integram a glândula albuminosa situada na porção feminina do trato reprodutivo dos adultos pulmonados. A sua síntese é destinada aos ovos, sendo a reserva mais nutritiva para os embriões em desenvolvimento. Esta fonte energética pode ser demandada de forma emergencial quando se esgotam as reservas de glicogênio estocadas. A glândula albuminosa é ainda responsável pela participação da formação do líquido dentro das bolsas que circundam os embriões, denominado fluido peri-vitelínico, no qual é rico em proteínas e galactogênio, nutrindo o embrião, de acordo com Goudsmit (1972, 1973).

Os gastrópodes fazem excreção sob condições fisiológicas normais de íons de amônio e sob estresse fisiológico liberam formas alternativas a partir de um padrão ureotélico (ureia) ou uricotélico (ácido úrico). A hemolinfa carrega aminoácidos e amônia para serem metabolizados e excretados respectivamente. Porém, suas

concentrações na hemolinfa podem indicar situação de estresse por atividade do metabolismo de proteínas e ácidos nucleicos, resultando na produção de ureia, amônia ou ácido úrico. Essas alterações constituem um mecanismo adaptativo para situações adversas que ocorrem com os moluscos (BECKER, 1983). Podendo verificar as estruturas morfológicas de *P. columella* na Figura 2.

Figura 2. Fotomicrografia da morfologia dos órgãos que compõem a massa visceral do molusco *Pseudosuccinea columella* mediante coloração Hematoxilina-Eosina, evidenciando pela letra A- massa cefalopediosa; B- manto; C- glândula albuminosa; D e E- glândula digestiva; F- ovotestis.



Fonte: O autor.

2.1.2 Formas de controle

As formas de prevenção e a implantação de um programa de controle integrado e efetivo para a fasciolose têm sido um problema constante. O uso de controle químico no hospedeiro definitivo, passando por medidas de manejo do rebanho, medidas de controle do molusco transmissor e até mesmo adaptações de instalações em áreas de alto risco são as principais formas de controle preconizadas (FAIRWEATHER, 2011).

O uso de medicamentos frente ao parasitismo nos hospedeiros definitivos é um dos principais métodos de controle. No entanto, o uso indiscriminado tendenciou o surgimento de resistência a diferentes classes de *fármacos*. Esse fator é o incentivo para o desenvolvimento de medidas alternativas de controle de parasitos de importância médico-veterinária (COSTA; SIMÕES; RIET-CORREA, 2011).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) a niclosamida (N-(2-cloro-4-nitrofenil)-5-clorosalicilanilida), denominada comercialmente por Bayluscide® é recomendada como uso frente a moluscos de importância na saúde pública (PINHEIRO *et al.*, 2003; KING; BERTSCH, 2015). No entanto, o uso de moluscicida sintético tem gerado preocupação em relação a fatores como: toxicidade para outras espécies, devido à sua baixa seletividade e contaminação do meio ambiente (CANTANHEDE *et al.*, 2010).

Esta condição tem incentivado a busca por métodos alternativos de controle, da população de moluscos hospedeiros. O uso de extratos/óleos oriundos de plantas medicinais com potencial moluscicida têm sido estudados em diferentes partes do mundo (PRAKASH; SINGHAL; GRUPTA, 1980; ALVAREZ-MERCADO *et al.*, 2015). O controle biológico frente aos invertebrados que participam do ciclo de vida de alguns parasitos a partir da utilização de nematoides entomopatogênicos (TUNHOLI *et al.*, 2017a) e de fungos (BRAGA; DE ARAÚJO, 2014) têm também demonstrado excelentes resultados.

Os fungos e NEPs são agentes biológicos facultativos encontrados naturalmente em solos, que sabidamente demonstram potencial moluscicida (TUNHOLI *et al.*, 2011a; TUNHOLI *et al.*, 2017 ab). Também avaliado o potencial ovicida de fungos, Duarte *et al.* (2015) estudaram a vulnerabilidade de massas ovígeras de *Biomphalaria glabrata* submetidas a infecção de *Metarhizium anisopliae* em condições laboratoriais. A viabilidade dos ovos, bem como, a maturação das massas ovígeras do molusco hospedeiro diminuíram significativamente após exposição aos conídios e hifas do fungo, sugerindo, portanto, sua utilização em programas de controle biológico. Já Castro *et al.* (2019) avaliou a utilização de *Pochonia chlamydosporia* isolado pc-10 em massas ovígeras de *P. columella*, inibindo o processo de embriogênese que comprometeu a viabilidade dos ovos dentro das massas.

2.2 Nematoides entomopatogênicos

De acordo com a taxonomia, a ordem Rhabditida abrange os NEPs. Inserida nesta ordem, quatro famílias demonstram maior importância sendo Mermithidae, Sphaerulariidae, Steinernematidae e Heterorhabditidae. Esses nematoides apresentam a capacidade de infectar, desenvolver e matar populações de insetos alvos considerados como pragas agrícolas e de relevância médica e veterinária, sendo por isso extensivamente utilizados no controle biológico destes organismos (POPIEL, HOMINICK, 1990; HAZIR *et al.*, 2003; DOLINSKI, 2006). Dentre as famílias citadas duas se destacam e têm sido alvo de inúmeras pesquisas: Steinernematidae, que compreendem espécies do gênero *Steinernema*, e a família Heterorhabditidae, englobando espécies do gênero *Heterorhabditis* (ADAMS *et al.*, 2006).

Os nematoides apresentam relação interespecífica, especialmente com insetos, exibindo interações que vão do comensalismo ao parasitismo obrigatório. Em tais relações, os nematoides podem ser encontrados no exoesqueleto ou nos sistemas digestivo, reprodutivo e excretor, bem como na hemocele, exemplificando o comensalismo. As espécies em sua maioria, bem como as de vida livre, podem se alimentar da microflora ou microfauna associadas aos insetos mortos (KAYA; STOCK, 1997).

Os nematoides entomopatogênicos apresentam atividades efetivas e características promissoras como agentes de controle, abrindo novos caminhos para o desenvolvimento de novas técnicas que visam incorporar estes agentes em formulações voltadas no controle efetivo, funcional e adequado de parasitos no ambiente (VIDAL *et al.*, 2018b).

2.2.1 Ciclo biológico dos NEPs

Durante seu ciclo de vida é encontrada livre no solo, uma forma larval de resistência conhecida como juvenil infectante (JI). Os JIs possuem orifícios naturais (boca e ânus) não atuantes nessa fase e duas cutículas sobrepostas, de forma a evitar dessecação e conferir maior tempo de sobrevivência (ALMENARA *et al.*, 2012).

Os JIs infectam um inseto adulto ou larva ativamente, penetrando através de orifícios naturais como boca, ânus ou espiráculos respiratórios e menos comumente, podem realizar a penetração do exoesqueleto em locais menos resistentes. Os JIs apresentam em seu tubo digestivo uma monocultura de bactérias endosimbiontes dos gêneros *Xenorhabdus* e *Photorhabdus*, que permanecem com crescimento e metabolismo controlados dentro do intestino do JI, até que este encontre um inseto para infectar (BOEMARE *et al.*, 1993; ALMENARA *et al.*, 2012).

Conseguindo avançar a principal cavidade do inseto, o hemoceloma, eles liberam as bactérias contidas no trato intestinal, mediante regurgitação, iniciando um quadro de infecção generalizada no inseto alvo. Essas bactérias rapidamente lesam ou matam o inseto, etapa em que Ciche e Ensign (2003) afirmam ocorrer entre 24 e 48 horas após infecção, dando início ao processo de bioconversão do cadáver, este processo se dará pela proliferação intensa das bactérias que secretam metabólitos secundários, toxinas e exoenzimas (ALMENARA *et al.*, 2012).

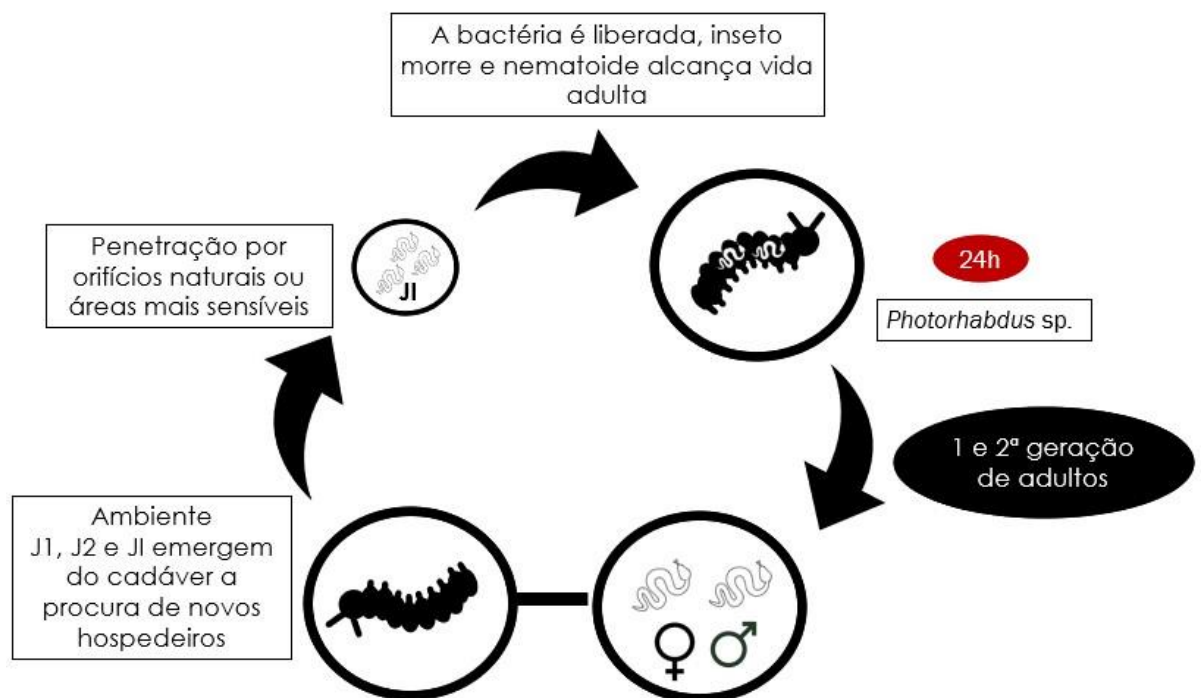
O gênero *Heterorhabditis* (NGUYEN; SMART JR, 1992), a partir da entrada do JI no inseto, regurgita bactérias Gram negativas e anaeróbias pertencentes ao gênero *Photorhabdus* spp., que passam a degradar tecidos internos do organismo alvo fomentando as etapas de nutrição e de desenvolvimento do nematoide. Os juvenis se desenvolvem e por meio de mudas sucessivas originam os adultos de primeira geração, que mostram-se hermafroditas com características morfológicas femininas (POINAR, 1990). Esta condição biológica favorece o sucesso de infecções em insetos por *Heterorhabditis*, pois mesmo havendo a infecção por um único JI, este apresentará a capacidade de realizar autofecundação culminando na produção de ovos (ALMENARA *et al.*, 2012).

Há também uma ação chamada endotoquia matricida que é a eclosão dos juvenis no interior do corpo da mãe ou já liberados, matando a fêmea ou hermafrodita. A partir da segunda geração de *Heterorhabditis* surgem machos e fêmeas, e a reprodução agora ocorrerá impreterivelmente por fertilização cruzada entre eles (ALMENARA *et al.*, 2012). Ocorre a cópula e as hermafroditas-fêmeas fecundadas ovipõem os ovos fertilizados. Estes poderão permanecer na fêmea até a eclosão dos juvenis de estágio 1 (J1), que rompem a parede do corpo da fêmea, atingindo a cavidade do inseto.

Os JI de *Heterorhabditis* penetram sem utilizar orifícios naturais do inseto. A presença de um dente córneo permite que os JIs perfurem a cutícula do inseto,

especialmente em regiões mais finas e flexíveis (FORST, CLARKE, 2002). Alguns J1 vão mudar para o estágio J2 e, mais tarde, vão se transformar em JI (J3 infectantes), retendo a cutícula do estágio anterior. Outros J1 vão completar o ciclo de desenvolvimento, passando por J2, J3, J4. Tornando-se adultos, copulam e novos ovos e/ou juvenis são liberados. Quando os recursos energéticos esgotarem, os ciclos reprodutivos são interrompidos e os JIs migram para o meio ambiente, onde permanecem até encontrarem outro inseto, reiniciando um novo ciclo (ALMENARA *et al.*, 2012), demonstrados pela Figura 3.

Figura 3. Esquema do ciclo de vida dos nematoides entomopatogênicos do gênero *Heterorhabditis* dentro de um inseto.



Fonte: O autor.

2.3. Nematoides entomopatogênicos como controle biológico de parasitos

Os NEPs têm várias características que os tornam desejáveis agentes de controle biológico de parasitos, dentre as quais se destacam: apresentam elevada virulência; são facilmente cultiváveis *in vitro*; possuem grande variedade de hospedeiros, sendo altamente específicos para artrópodes; são móveis e possuem alto potencial reprodutivo (KAYA; GAUGLER, 1993).

Além das citadas, outras características são favoráveis a utilização dos NEPs como controladores potenciais de pragas: baixo custo em produções, tanto artificial ou ambiental dos insetos hospedeiros; facilidade de armazenamento e manutenção; aplicação no campo e compatibilidade com diversos pesticidas (GREWAL; DE NARDO; AGUILLERA, 2001; DOLINSKI, 2006).

Os NEPs se destacam quanto a seguridade em vertebrados, plantas e outros microrganismos não alvos, além de apresentarem aplicação facilitada, sendo a dispersão por meio de equipamentos de irrigação um método de aplicação bastante utilizado a campo (GEORGIS; PONAIR, 1989; AKHURST; BOEMARE, 1990; GEORGIS, 1990; GORSUCH, 1982). Porém, o efeito de NEPs na medicina veterinária tem sido pouco relatado (VIDAL *et al*, 2018b), sendo considerados principalmente estudos em ectoparasitos.

Monteiro *et al.* (2010) avaliaram a influência da infecção de *H. amazonensis* RSC-5 em fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* comprometendo a taxa de oviposição, sobrevivência e reprodução deste ixodídeo. Silva *et al.* (2012) verificaram que *H. indica* (LPP1) reduziu significativamente o índice de produção de ovos, eclosão de embriões e de massas de ovos de *R. microplus*.

Cardoso *et al.* (2013) caracterizaram a relação de *S. glaseri* em ninfas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* sobre os parâmetros relacionados com a ecdise, mortalidade e postura de fêmeas ingurgitadas. Como resultado, a exposição ao NEP induziu quebra da homeostase na população alvo, induzindo alterações fisiológicas e biológicas, com efeitos proporcionais ao número de NEPs utilizados.

Estudos sobre o potencial desses agentes para o controle biológico de moscas demonstraram a infectividade dos nematoides *S. feltiae*, *S. glaseri* e *H. heliothidis* em larvas, pupas e fases adultas de *Musca domestica* (GEDEN; AXTELL; BROOKS, 1986). Para tais autores, as larvas de segundo e terceiro instar e moscas adultas mostraram-se altamente susceptíveis a *S. feltiae* e *H. heliothidis*. Taylor *et al.* (1998), a partir de estudos experimentais, avaliaram o potencial entomopatogênico de oito espécies de *Heterorhabditis* e cinco de *Steinernema* em larvas de terceiro estágio de *M. domestica*. As espécies de *Steinernema* revelaram maior virulência em relação as espécies de *Heterorhabditis*, sendo que a cepa que apresentou maior efetividade foi a de *S. feltiae* SN, sobrevivendo no esterco por cerca de 10 dias.

Estudos de Mahmoud, Mandour e Pomazkov (2007) evidenciaram susceptibilidade das fases larval, pupal e adulta das moscas *Lucilia sericata*,

Calliphora vicina, *M. domestica* e *Stomoxys calcitrans* ao nematoide *S. feltiae* (N-33), resultando em mortalidade de larvas de segundo e terceiro instar para todas as espécies de moscas analisadas frente a *S. feltiae*. Em análise subsequente, Pierce (2012) testou sob condições laboratoriais e a campo a influência da infecção por *Steinernema* spp. e *Heterohabditis* spp. frente as primeiras fases de desenvolvimento da mosca dos estábulos (*S. calcitrans*). Segundo tal autor, os isolados de NEPs utilizados neste estudo induziram mortalidade maior quando administrados em associação, desempenhando efeito sinérgico entre eles.

Recentemente, Leal *et al.* (2017) verificaram sob condições de laboratório a susceptibilidade de estágios imaturos de *S. calcitrans* a infecção por *H. bacteriophora* (isolado HP88) e *H. baujardi* (isolado LPP7), onde demonstraram que todas as concentrações de NEPs avaliadas apresentaram potencial larvicida, com a HP88 mostrando-se mais virulenta.

São raros os estudos que remetem a utilização de NEPs como agentes controladores de populações de moluscos gastrópodes. Dentre estes estudos, Tunholi *et al.* (2014) verificaram que espécimes de *H. indica* LPP1 apresentaram elevada patogenicidade em *Biomphalaria similares*, culminando com uma taxa de mortalidade de 55%, além de favorecer relevantes desordens fisiológicas no molusco hospedeiro, caracterizadas pelo aumento no nível de ácido úrico e a redução do teor de ureia na hemolinfa deste.

O molusco *L. columella* mostrou-se susceptível a JI de *H. baujardi* LPP7, segundo Tunholi *et al.* (2017a). Para tais autores, a exposição do limneídeo ao NEP resultou em uma taxa de mortalidade de 66,66%. Em adição, todos os parâmetros reprodutivos foram alterados em decorrência da infecção, demonstrando a ocorrência do fenômeno de castração parasitária em *L. columella*. Estes resultados sugerem a utilização de *H. baujardi* LPP7 como potencial alternativa no controle biológico da população deste hospedeiro intermediário e, por conseguinte das doenças no qual participa na cadeia epidemiológica, especialmente a fasciolose, atendendo assim as recomendações preconizadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção de *Pseudosuccinea columella*

Os espécimes de *P. columella* foram coletados a partir de bebedouros do setor de bovinocultura do Instituto Federal do Espírito Santo (IFES), localizado no município de Alegre, Espírito Santo, Brasil, está reconhecido pelo registro do SISBIO nº 65664-1 de 23/08/2018. No laboratório de Parasitologia do Hospital Veterinário do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUE-UFES), os moluscos coletados foram acondicionados em aquários de vidro (12x24x14 cm) contendo água decolorada, argila esterilizada e suplementação à base de cálcio, apresentando ainda aeração artificial contínua e placas de poliestireno (± 5 cm), as quais atuaram como substratos para a oviposição. A temperatura ambiente foi estabilizada a 24°C, sendo os moluscos alimentados com folhas de alface (*Lactuca sativa*) *ad libitum*, renovadas em dias alternados, evitando com isso a sua fermentação. A limpeza dos aquários foi realizada conforme necessário.

A identificação dos exemplares foi a partir de dissecação e identificação morfológica realizada pela FIOCRUZ, baseado na metodologia (PARAENSE,1982).

3.2 Obtenção de nematoides entomopatogênicos *Heterorhabditis baujardi* LPP7

Os juvenis infectantes (JIs) de nematoides entomopatogênicos *H. baujardi* LPP7, utilizados no presente estudo foram cedidos pelo Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Rio de Janeiro, Brasil. Os NEPs foram armazenados e transportados em garrafas de cultivo celular de 40 mL, mantido em estufa B.O.D até a realização experimental a 16°C para que estabilização de sua fase de latência. Em média três horas antes dos ensaios experimentais, os espécimes de NEPs foram retirados da B.O.D e deixados a temperatura ambiente (24-25°C) para sua reativação, como recomendado pelos padrões do laboratório que forneceu os organismos.

3.3 Exposição experimental de *Pseudosuccinea columella* a *Heterorhabditis baujardi* LPP7

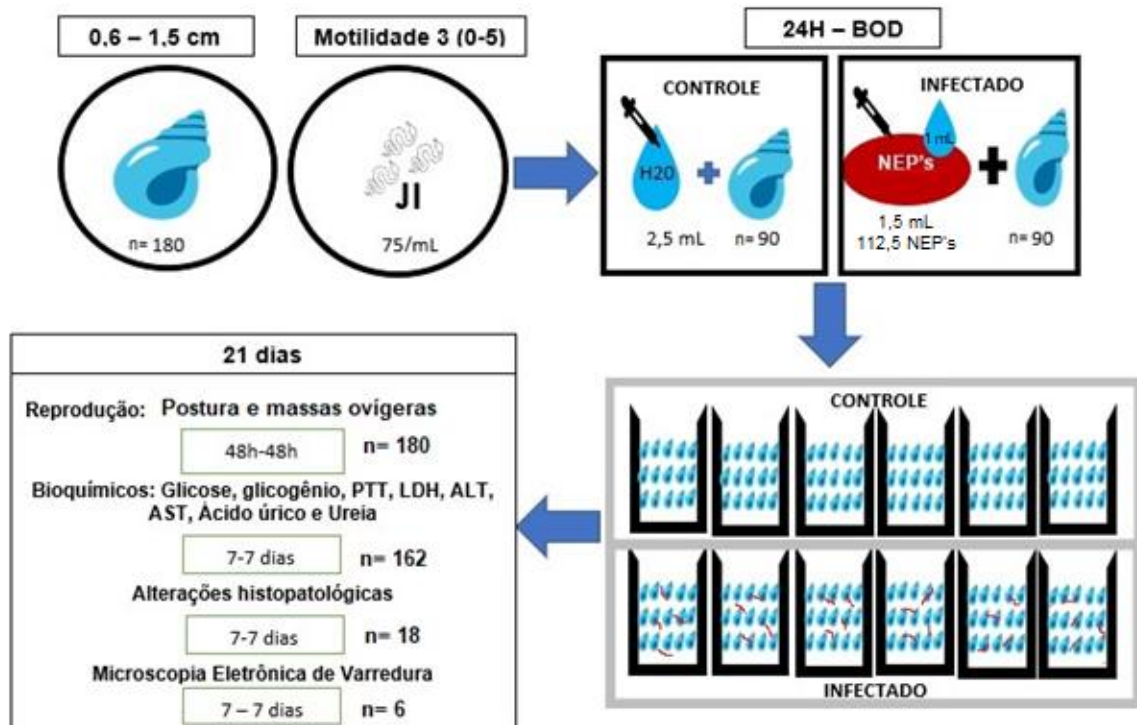
Após o armazenamento em B.O.D os NEPs foram submetidos a temperatura de 24°C por três horas, para estimular a sua motilidade. Em seguida, foi efetuada a homogeneização da solução presente na garrafa e coletados quinze microlitros da suspensão de NEPs sendo depositados em lâmina de vidro para análise em microscópio utilizando aumento de 100x, a fim de estabelecer a quantidade de JI/mL com a quantidade média baseada em Zimmermann, Luth e Esch (2013).

Para o experimento foram utilizados um total de 180 moluscos, sendo alcançadas as metragens das conchas com auxílio de um paquímetro [Western -8cm]. Os espécimes selecionados para o estudo possuíram diâmetro de concha entre 0,6-1,5 cm (denotada maturidade sexual), estes foram divididos randomicamente em dois grupos experimentais formados por 90 moluscos cada. O primeiro grupo foi definido como grupo controle (GC), sem a exposição dos NEPs, com os moluscos mantidos em água destilada e o grupo exposto (GE), na qual foi verificado a exposição dos moluscos a 75 JI/mL. Todo o experimento foi conduzido em sextuplicata compreendendo quinze réplicas para cada repetição, feitas ao acaso.

A exposição dos moluscos aos NEP's foi realizada em placas de 24 poços. Para isso, foram homogeneizados e adicionados 1,5 mL da solução contendo os NEPs e um mL de água destilada em cada poço da placa para o grupo exposto. Para o grupo controle, foram adicionados 2,5 mL de água destilada. Após isso, foi inserido um molusco por poço. Por fim, as placas foram identificadas e vedadas por Parafilm®, com orifícios para favorecer a manutenção da oxigenação e umidade relativa ideal. As placas foram então incubadas em uma estufa tipo B.O.D com controle de temperatura e umidade [Eletrolab] mantidas a 25-27°C e umidade de 85% por 24 horas.

Descrito pelo desenho esquemático dos processos ocorridos durante os 21 dias em forma de fluxograma, demonstrados pela figura abaixo (Figura 4).

Figura 4. Fluxograma dos principais processos ocorridos durante os 21 dias de experimentação, iniciado pela seleção e obtenção dos materiais utilizados (moluscos e nematoides entomopatogênicos), seguido da exposição experimental de *Pseudosuccinea columella* a *Heterorhabditis baujardi* LPP7 e um grupo controle, posteriormente acondicionados em aquários, separados pelos grupos (controle e exposto), findado pelas avaliações para verificar os mecanismos que levaram as alterações nos indivíduos expostos.



Fonte: O autor.

3.4 Análises Bioquímicas

A cada semana após a exposição durante as três semanas de avaliação, dez espécimes de cada grupo (GC e GE) foram escolhidos aleatoriamente para a coleta de hemolinfa e dissecação para obtenção da massa cefalopediosa (MC), glândula digestiva (GD) e glândula albuminosa (GA), nos quais foram baseados nas técnicas descritas por Vidal *et al.* (2019). Os tecidos coletados foram devidamente identificados e armazenados a -80°C até o seu processamento. As análises bioquímicas dos tecidos mencionados foram realizadas em parceria com o laboratório de Biofísica, do

Departamento de Ciências Fisiológicas, do Instituto de Biologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Dentre as análises, foram realizadas a quantificação espectrofotométrica de substratos energéticos (glicogênio, glicose, proteínas totais), atividades enzimáticas (lactato desidrogenase (LDH), aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT)), além de produtos nitrogenados de degradação (ureia e ácido úrico).

3.4.1 Glicogênio e glicose

Os conteúdos de glicogênio estocados nos tecidos da MC e GD foram determinados por meio do método 3,5 dinitro salicilato (DNS), com os resultados sendo expressos em mg de glicose/g de tecido vivo em peso fresco. Já a determinação da concentração hemolinfática de glicose livre foi estabelecida a partir de kits laboratoriais (Doles®). Para isto, uma alíquota de 10 µL de hemolinfa, relativo a cada grupo experimental foi requerida. Adicionou-se ao volume inicial, 1 mL do reagente de cor, composto por: solução tampão de fosfato 0,05 M, pH 7,45±0,1; aminoantipirina (0,03 mM) e 15 mM de p-hidroxibenzoato de sódio; um mínimo de 12 kU de glicose oxidase e 0,8 kU de peroxidase por litro foi estabelecido; sequencialmente, a determinação sérica de glicose foi medida por meio da leitura em espectrofotômetro, com absorvância máxima em 510 nm, utilizando uma solução aquosa de 100 mg/dL (PINHEIRO; GOMES, 1994).

3.4.2 Proteína total (PTT)

A dosagem de proteínas totais foi realizada de acordo com a técnica do Biureto, descrita por Weichselbaum (1946), que é um método de quantificação colorimétrica a partir de hemolinfa. Fez-se necessário 50 µL da amostra, na qual foi misturada a 2,5 mL do reagente Biureto (citrato trissódico 0,114 M, carbonato de sódio 0,21 M e sulfato de cobre 0,01 M), homogeneizados e deixados em temperatura ambiente por 5 minutos, seguido pela leitura espectrofotométrica realizada em 550 nm. Os resultados foram expressos em g/dL.

3.4.3 Lactato desidrogenase (LDH)

A mensuração da atividade da lactato desidrogenase foi estabelecida a partir da hemolinfa, por meio de uma sequência de reações químicas que resultou na formação de um complexo corado. Para a ocorrência destas reações, misturou-se 1mL de solução de substrato (solução 0,1 M de lactato, 0,005 M de o-fenantrolina em Tris 0,2 M pH 8,8) em uma gota de solução 0,012 M de sulfato de ferro amoniacal (alúmen férrico) e 25 µl de amostra, resultando em uma solução que foi submetida em banho-maria a 37°C por 2 minutos. Em seguida, acrescentou uma gota de solução contendo NAD (15,82 mmol de nicotinamida adenina dinucleotídeo) e FMS (3,73 mmol de fazina metassulfato). A solução final foi novamente homogeneizada e incubada por 5 minutos a 37°C, onde a absorbância foi estabelecida em espectrofotômetro, utilizando comprimento de onda de 510 nm, padronizada por uma solução de LDH 350 U./l (BISHOP; ELLIS; BURCHAM, 1983). Os resultados foram expressos em UI (unidade internacional).

3.4.4 ALT e AST

As atividades enzimáticas da alanina e aspartato aminotransferases (ALT e AST) foram obtidas por meio de hemolinfa, incubada em solução prévia de reagentes composta por L-alanina a 0,2 M ou L-aspartato a 0,2 M, mais α -cetoglutarato e tampão fosfato de sódio a 0,1 M pH 7,4 a 37°C durante 5 minutos. Em seguida, 100 µl (para ALT) e 200 µL (para AST) de hemolinfa foram homogeneizados e novamente incubados a 37°C, por 30 minutos. Posteriormente, 50 µL de 2,4 dinitrofenilhidrazina 0,001 M foram adicionados e mantidos a 25°C por 20 minutos, finalizando com a adição de 5 mL de NaOH 0,4 M. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 505 nm, tendo os resultados expressos em URF/ml (KAPLAN; PESCE, 1996).

3.4.5 Ácido úrico e ureia

A determinação de ácido úrico foi realizada a partir de uma alíquota de 50 µL da amostra hemolinfática, adicionada à 2 mL da solução reagente de cor, composta por tampão fosfato de sódio 100 mmol/l (pH 7,8), 4 mmol/l diclorofenol-sulfonato, 4-aminoantipirina 0,5 mmol/l, 120 U ≤ uricase, 4,980 U ≤ ascorbato oxidase, 1.080 U ≤ peroxidase. Em seguida, homogeneizou e incubou a solução resultante a 37°C durante 5 minutos. Por sua vez, a concentração hemolinfática de ureia foi estabelecida pela adição de 2 mL de solução composta por 60 mmol de salicilato de sódio, nitroprussiato de sódio, 34 mmol, mais EDTA dissódico 1,35 mmol, em 2 µL de urease e 20 µL de hemolinfa. As leituras foram feitas a partir de espectrofotômetro a 520 nm e 600 nm de absorvância, respectivamente, tendo os resultados expressos em mg/dL (BISHOP; ELLIS; BURCHAM, 1983; CONNERTY; BRIGGS; EATON, 1955).

3.5 Avaliação da taxa de mortalidade e da biologia reprodutiva de *P. columella* pós-exposição a *H. baujardi* LPP7

Os grupos experimentais foram divididos em doze subgrupos constituídos de 15 moluscos cada, acondicionados em aquários respectivos, sendo seis correspondentes ao GC e seis ao GE. A manutenção dos aquários e a alimentação dos moluscos foram realizadas conforme descrito no item 3.1, sendo adicionadas placas de poliestireno para à verificação da postura de massas ovíferas. A observação e contabilização dos ovos postos/massas ovíferas foi realizada em dias alternados, sob auxílio de microscópio estereoscópico, e sucedida por trocas das placas. Além da verificação da viabilidade dos exemplares para ser realizado o cálculo de mortalidade. Esta avaliação ocorreu em dias alternados e ao longo de três semanas pós-exposição, conforme descrito por Tunholi *et al.* (2017a). As placas utilizadas como substratos para a oviposição foram numeradas individualmente após contagem, colocadas em aquários livres de espécimes adultos, para que seu desenvolvimento ocorresse de forma adequada.

3.6 Avaliação das alterações histológicas de *Pseudosuccinea columella*

Nas análises histopatológicas, foram realizadas a partir de três espécimes de moluscos de cada grupo (GC e GE), escolhidos de forma aleatória, a cada sete dias durante três semanas seguidas. Foram baseadas segundo as técnicas de fixação e processamento descritas por Vidal *et al.* (2019). Após o processamento, as amostras foram coradas pela técnica de hematoxilina e eosina (HE) e pelos métodos de coloração especial de Von Kossa e Tricômio de Masson (LUNA, 1968).

3.7 Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)

Em relação as análises ultraestruturais, foi coletado um espécime de cada grupo, a cada sete dias ao longo de todo o experimento, seguindo as técnicas descritas por Vidal *et al.* (2019). Todo o processamento do material foi realizado em parceria com o Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins (LUCCAR) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Iniciou-se pela retirada da concha e a obtenção do monobloco dos órgãos inteiros, procedendo a imersão dos tecidos por no mínimo 24 horas em solução fixadora à base de glutaraldeído, PBS e paraformaldeído (KARNOVISKY, 1965).

Uma vez fixados, ocorreu a lavagem dos tecidos para retirada do excesso de solução fixadora, em cacodilato 0,1 M (pH 7,2-7,4) por três vezes, durante 30 minutos. Após isso, os tecidos foram submetidos a etapa de pós-fixação em tetraóxido de ósmio (OsO₄ 1%) e cacodilato 0,1M, adicionando ferrocianeto de potássio 1,25%. Em seguida, o recipiente utilizado durante esta etapa foi embrulhado com papel laminado, e deixado por 1 hora à temperatura ambiente em capela e no escuro. Feito isso, ocorreu um novo processo de lavagem em tampão cacodilato por 30 minutos, seguido pela desidratação do tecido, que se deu por meio de banhos em etanol à temperatura ambiente, com o seguinte passo: 30% - 30 minutos; 50% - 30 minutos; 70% - overnight (geladeira); 90% - 30 minutos; 100% - por 3 vezes de 30 minutos cada.

A segunda fase de secagem ocorreu em uma câmara de gás, para obtenção do ponto crítico. Trata-se de uma secagem realizada em câmara pressurizada, usando gás carbônico como fluido de transição. Uma vez secos, os tecidos foram destinados

a montagem em suporte porta-amostra para MEV, ou “stub”, ajustando sua orientação em relação aos feixes de elétrons e ao coletor de imagens. Subsequentemente, uma cobertura de ouro para promover e aumentar a condutividade da superfície da amostra, bem como aumentar a emissão de elétrons foi estabelecida. Finalizando, com estudo topográfico em varredura.

3.8 Análise dos dados

Para a comparação dos parâmetros bioquímicos, os valores obtidos foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro Wilk. Em seguida, os dados inerentes as análises bioquímicas, foram submetidas ao teste ANOVA e de comparação de médias Teste T (T) e as análises reprodutivas foram submetidas ao teste ANOVA (F) e de comparação de médias Tukey-kramer (Q), utilizando o Programa BioEstat, versão 5.0 com 0,05% de significância.

Já as avaliações morfológicas foram realizadas em Microscópio Óptico Olympus, sendo as imagens registradas no aumento de 40x, 100x, 200x e 1000x e em Microscópio Eletrônico (JEOL-JEM 6610 LV, Inc. USA) com os registros nos aumentos de 15x, 50x e 150x e foram desempenhadas a partir de análises descritivas.

4. RESULTADOS

4.1. Alterações bioquímicas em *P. columella* expostas a *H. baujardi* LPP7

A exposição experimental de *P. columella* a *H. baujardi* LPP7 contribuiu para a quebra da homeostase glicídica e proteica no molusco hospedeiro. Conforme demonstrado na tabela 1, pode-se observar uma diminuição nas concentrações hemolinfáticas de proteínas totais logo na primeira semana de análise nos exemplares expostos ($5,94 \pm 0,18$) em relação ao grupo controle ($8,08 \pm 0,39$), reestabelecendo seus níveis nas semanas subsequentes. Mesma tendência de variação foi verificada para as concentrações séricas de glicose. Neste contexto, os níveis hemolinfáticos de glicose decresceu significativamente após a primeira ($74,01 \pm 2,30$) e segunda semanas ($82,58 \pm 6,33$) pós-exposição, quando comparado a moluscos não expostos, sendo seus níveis restabelecidos na terceira semana de exposição.

Intensa glicogenólise no complexo gônada-glândula digestiva de *P. columella* expostas ao *H. baujardi*, LPP7 foi observada após a primeira e a segunda semanas de estudo. No entanto, quando analisada a concentração de glicogênio na massa cefalopediosa, nenhuma variação foi detectada entre moluscos expostos e não expostos.

Ademais, a exposição ao nematoide resultou em um aumento significativo nas atividades hemolinfáticas da lactato desidrogenase (LDH), aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) na primeira e segunda semanas em *P. columella* (Tabela 1).

Concomitantemente a diminuição das concentrações séricas de proteínas totais, aumento de 22,31% e 98,48% (primeira e segunda semana, respectivamente) nos conteúdos de ácido úrico em moluscos expostos a *H. baujardi*, LPP7 e os níveis séricos de ureia não demonstraram alterações significativas em nenhum dos momentos analisados.

Tabela 1. Parâmetros bioquímicos de *Pseudosuccinea columella* expostas e não expostas a *Heterorhabditis baujardi* LPP7 ao longo de três semanas.

| Análises bioquímicas | Semana | Controle | Infectado |
|--------------------------------------------------------------------|----------------|---------------------------|----------------------------|
| Proteína total (g/dL) | 1 ^a | 8,08 ± 0,39 ^a | 5,94 ± 0,18 ^b |
| | 2 ^a | 8,23 ± 0,20 ^a | 8,32 ± 0,45 ^a |
| | 3 ^a | 7,92 ± 1,09 ^a | 8,85 ± 1,02 ^a |
| Glicose (mg/dL) | 1 ^a | 110,99±4,12 ^a | 74,01 ± 2,30 ^b |
| | 2 ^a | 113,02±3,41 ^a | 82,58 ± 6,33 ^b |
| | 3 ^a | 110,43±4,32 ^a | 113,15 ± 3,68 ^a |
| Glicogênio Complexo-gônada-glândula digestiva (mg/g de tec) | 1 ^a | 39,98 ± 1,58 ^a | 3,24 ± 0,26 ^b |
| | 2 ^a | 41,39 ± 1,47 ^a | 29,41 ± 3,44 ^b |
| | 3 ^a | 41,37 ± 1,63 ^a | 40,29 ± 3,09 ^a |
| Glicogênio Massa cefalopédiosa (mg/g de tec) | 1 ^a | 23,01 ± 0,27 ^a | 22,15 ± 0,30 ^a |
| | 2 ^a | 22,58 ± 0,42 ^a | 22,41 ± 0,44 ^a |
| | 3 ^a | 22,62 ± 0,37 ^a | 22,29 ± 1,09 ^a |
| Lactato desidrogenase (UI) | 1 ^a | 17,74 ± 2,52 ^b | 33,45 ± 4,56 ^a |
| | 2 ^a | 19,03 ± 2,20 ^b | 40,32 ± 4,45 ^a |
| | 3 ^a | 17,92 ± 2,30 ^a | 16,85 ± 4,08 ^a |
| ALT (URF/mL) | 1 ^a | 6,08 ± 3,41 ^b | 59,94 ± 4,23 ^a |
| | 2 ^a | 6,23 ± 2,83 ^b | 39,41 ± 3,44 ^a |
| | 3 ^a | 7,92 ± 2,26 ^a | 6,29 ± 3,09 ^a |
| AST (URF/mL) | 1 ^a | 28,74 ± 3,11 ^b | 99,86 ± 3,03 ^a |
| | 2 ^a | 26,23 ± 4,03 ^b | 82,67 ± 5,94 ^a |
| | 3 ^a | 27,92 ± 3,26 ^a | 30,29 ± 4,09 ^a |
| Ácido Úrico (mg/dL) | 1 ^a | 10,04 ± 0,20 ^b | 12,28 ± 0,39 ^a |
| | 2 ^a | 9,23 ± 0,13 ^b | 18,32 ± 0,45 ^a |
| | 3 ^a | 9,92 ± 0,39 ^a | 9,04 ± 0,35 ^a |
| Ureia (mg/dL) | 1 ^a | 0,11 ± 0,01 ^a | 0,19 ± 0,12 ^a |
| | 2 ^a | 0,23 ± 0,13 ^a | 0,28 ± 0,15 ^a |
| | 3 ^a | 0,32 ± 0,06 ^a | 0,29 ± 0,09 ^a |

^{a, b} = Médias e desvios padrões seguidos pela mesma letra nas linhas não diferem significativamente entre si pelo teste T (p>0,05).

4.2. Avaliação da taxa de mortalidade e da biologia reprodutiva de *P. columella* expostas a *H. baujardi* LPP7

A exposição experimental aos JIs de *H. baujardi* LPP7 não induziu mortalidade em *P. columella*, no entanto, as alterações reprodutivas, a avaliação quantitativa das massas ovígeras, bem como de ovos postos por moluscos expostos e não expostos ao NEP, durante as três semanas de análises, encontram-se descritas na tabela abaixo (tabela 2). É notável que a performance reprodutiva do molusco hospedeiro (massa ovígera/molusco e número de ovos/massa ovígera) decresceu significativamente após a primeira semana de exposição. Estes resultados denotam claramente que a exposição ao NEP induziu em *P. columella* o fenômeno de castração parasitária, sendo esta precoce, temporária e parcial.

Tabela 2. Número de massas ovígeras por molusco e números de ovos postos de *Pseudosuccinea columella* expostos a *Heterorhabditis baujardi*. LPP7 durante três semanas de avaliação.

| Semana | Massas ovígeras | | Nº de ovos postos | |
|--------|--------------------|--------------------|---------------------|---------------------|
| | Controle | Infectado | Controle | Infectado |
| 1 | 10,21 ^a | 6,29 ^b | 268,75 ^a | 154,21 ^b |
| 2 | 18,56 ^a | 17,31 ^a | 415,94 ^a | 354,31 ^a |
| 3 | 18,67 ^a | 14,00 ^a | 319,83 ^a | 269,83 ^a |

^{a, b} = Médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

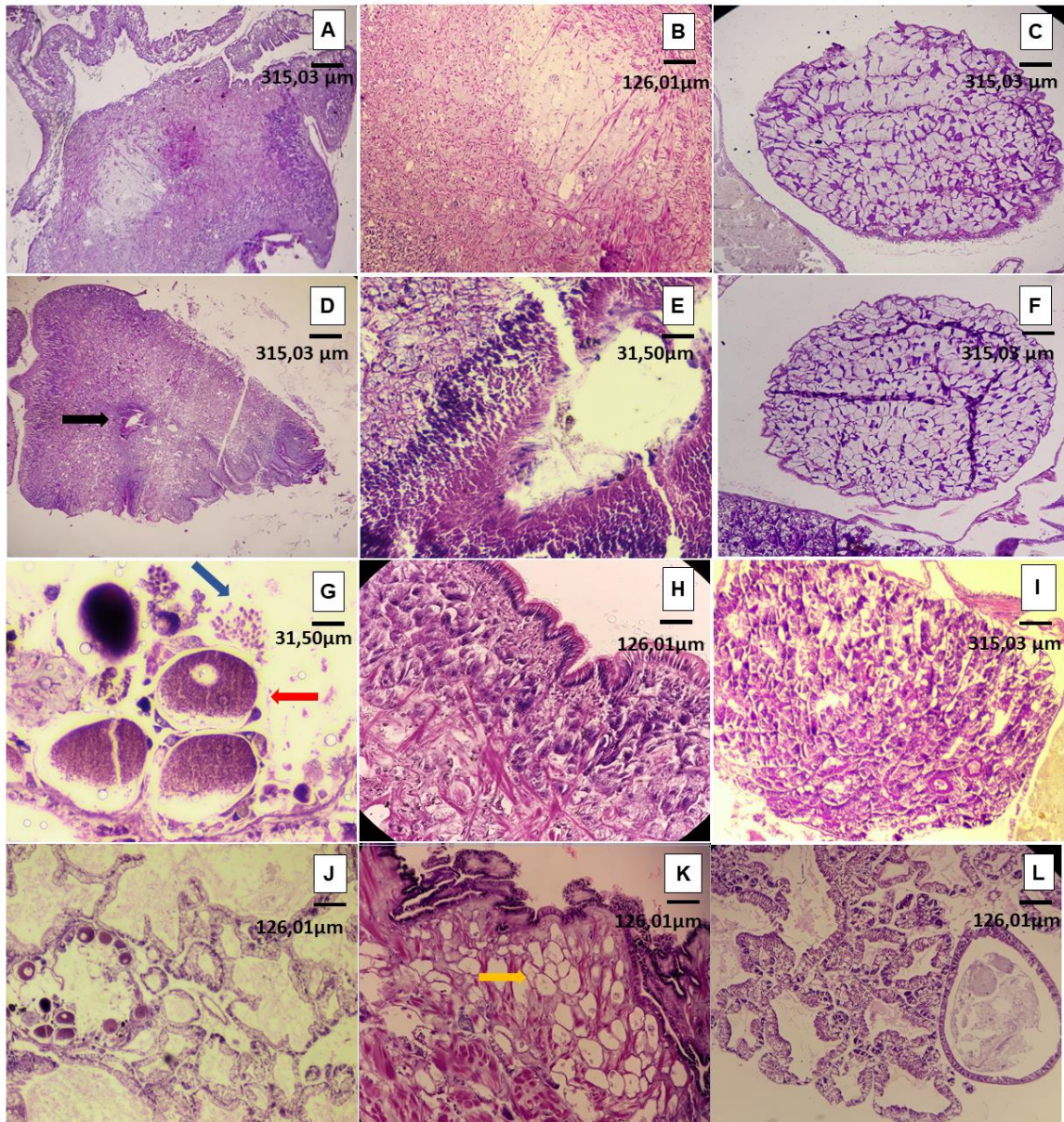
4.3. Alterações histológicas de *P. columella* expostas a *H. baujardi* LPP7

Na avaliação histopatológica dos indivíduos do grupo controle foram observados o manto, constituído por fibras de colágeno em emaranhados de tecido conjuntivo frouxo, em dois aumentos (Figura 5 A e B). ácinos glandulares bem circunscritos e delimitados que se organizam para integrarem a glândula albuminosa (Figura 5 C). Em adição, a glândula digestiva (Figura 5 H e I). apresenta-se constituída por uma série de lóbulos formados por ácinos, os quais possuem uma única camada de células epiteliais sem alterações; na glândula reprodutiva foram observadas

predominantemente células reprodutivas femininas (ovogônias) e masculinas (espermatogônias), em pleno desenvolvimento e produção de embriões (Figura 5 G).

As alterações histopatológicas foram observadas apenas nos caramujos expostos ao *H. baujardi* LPP7, no entanto, na glândula albuminosa, não foram verificadas alterações (Figura 5 F). Os outros órgãos, como o manto, houve alterações na arquitetura do órgão, apresentando áreas de necrose multifocais foram observadas nos caramujos após a primeira semana de exposição e na terceira semana, vacuolização multifocal e (Figura 5 D e E). Ademais, a glândula digestiva demonstrou vacuolização acentuada nos lóbulos, alterando os arranjos celulares contribuindo para a perda da integridade e arquitetura do tecido em questão, ocorrendo na terceira semana (Figura 5 K). Houve ainda um acúmulo de hemócitos nos espaços intertubulares da glândula digestiva, ocorrendo na segunda semana (Figura 5 L), demonstrando a indução de uma resposta inflamatória celular, que pode corroborar com a proliferação e deposição de matriz extracelular, constituindo as fibras elásticas e colágenas, além de tecido conjuntivo fibroso, que não foi verificado, pela coloração de Tricômio de Masson. Além destas alterações, o processo de calcificação metastática não foi evidenciado pelo método de coloração de Von Kossa. Na glândula reprodutiva pode ser observado redução no número de ovogônias e espermatogônias, a partir da primeira semana de exposição (Figura 5 J), retomando a normalidade na terceira semana. Após a terceira semana de análise, verificou aumento no número de células reprodutivas femininas e em seu desenvolvimento funcional.

Figura 5- Fotomicrografia da histopatologia de *Pseudosuccinea columella* em coloração H-E, evidenciando o Grupo Controle (A,B,C, G, H e I) e Grupo Exposto (D,E,F, J,K e L) sendo o manto sem alterações (A e B) e com áreas de necrose (D e E), glândula albuminosa sem alterações (C e F), ovotestis demonstrando diferença na quantidade de células femininas (G e J) e glândula digestiva normal (H, I) e com vacúolos (K) e infiltrado inflamatório e cisto (L). Evidenciando área de necrose (seta preta); espermatogônias (seta azul), ovogônia (seta vermelha) e vacuolização (seta amarela).

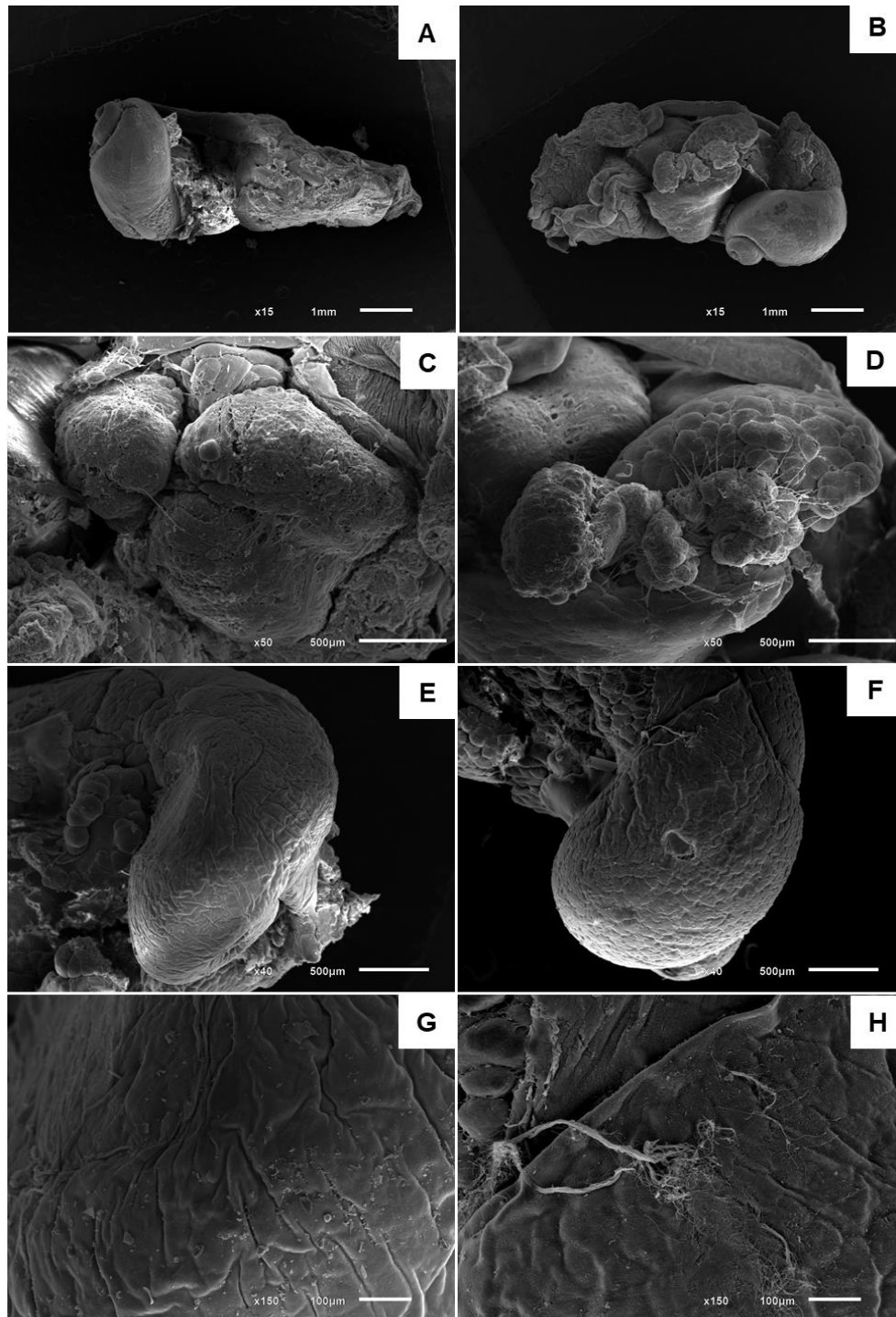


Fonte: O autor.

4.4. Microscopia eletrônica

Na microscopia eletrônica foram observados a morfologia topográfica dos órgãos que constituem a massa visceral dos caramujos amostrados, ao longo das três semanas pós-exposição. Nenhuma alteração foi denotada nos exemplares do grupo controle (Figura 6 A, C, E, G). Nos caramujos expostos ao *H. baujardi* LPP7 visualizou-se alterações de superfície da glândula albuminosa, com diminuição visual em seu tamanho (Figura 6 D). Na glândula digestiva foi observado uma lesão localizada apresentando um espaço e proliferação de fibras recobrando o mesmo (Figura 6 F e H).

Figura 6- Fotografia ultraestrutural de *Pseudosuccinea columella* em microscopia eletrônica de varredura, evidenciando a linha à esquerda o controle e a direita o exposto a *Heterorhabditis baujardi* LPP7 nas três semanas de avaliação, demonstrando estrutura geral (A e B), glândula albuminosa normal (C) e com fibras dispostas (D) e glândula digestiva normal (E e G) e apresentando lesão e fibras (F e H).



Fonte: O autor.

5. DISCUSSÃO

5.1 Alterações bioquímicas em *P. columella* expostas a *H. baujardi* LPP7

A indução da glicogenólise verificada no período estudado, pode ser em partes, como uma tentativa do hospedeiro em restabelecer seus níveis hemolinfáticos de glicose. Apesar do decréscimo constatado nos conteúdos de glicogênio, tal condição não se mostrou eficaz no restabelecimento dos níveis glicêmicos, sugerindo que a exposição ao nematoide induziu uma quebra na homeostase de carboidratos em *P. columella*. Como verificado no presente estudo os caramujos expostos ao NEPs, apresentaram redução significativa de suas reservas energéticas na glândula digestiva após a primeira e segunda semanas de análise, perfazendo uma redução precoce desses níveis, restabelecendo suas concentrações no final da terceira semana de estudo. Resultados similares foram verificados por Moore e Halton (1973), estudando a interface *Lymnaea truncatula*/*F. hepatica*. Para tais autores, a infecção pelo trematódeo estimulou à atividade das enzimas lisossomais da glândula digestiva deste hospedeiro, favorecendo a hidrólise do glicogênio, condição necessária para a manutenção da glicemia nestes hospedeiros. Como consequência, diminuição dos estoques de glicogênio e galactogênio são demonstrados, corroborando muitas das vezes para a ativação do catabolismo proteico e lipídico como mecanismos fisiológicos compensatórios (BECKER, 1980; TUNHOLI-ALVES *et al.*, 2011a; TUNHOLI *et al.*, 2011b).

A principal fonte energética utilizada por moluscos gastrópodes para a manutenção do seu metabolismo celular é representada por moléculas de glicose. Quando em excesso na hemolinfa, tais organismos direcionam este monômero para a síntese de reservas polissacarídicas, denominadas de glicogênio e galactogênio, que passam a ser estocadas em tecidos especializados, como a glândula digestiva e a massa cefalopediosa, e a glândula albuminosa, respectivamente (TUNHOLI-ALVES *et al.*, 2013).

Estudos demonstraram alterações no metabolismo de moluscos expostos a larvas de nematoides, que passam a capturar nutrientes e excretar metabólitos para a hemolinfa do hospedeiro, alterando sua composição. Com isso, o estabelecimento

de um balanço energético negativo é evidenciado, forçando o molusco a mobilizar suas reservas polissacarídicas, principalmente da glândula digestiva e massa cefalopediosa, para subsidiar a sua sobrevivência (DE SOUZA *et al.*, 2000; PINHEIRO; AMATO; LANFREDI, 2009; TUNHOLI *et al.*, 2017a). Vale, contudo, ressaltar que, Pinheiro *et al.* (2003) afirmaram que a glândula digestiva é o principal sítio metabólico em moluscos hospedeiros, abrigando o desenvolvimento de larvas de helmintos. Assim, acredita-se que o estabelecimento de *H. baujardi* LPP7 em *P. columella* se mostrou limitado a glândula digestiva do molusco hospedeiro, e em função disto, alterações nas concentrações de glicogênio na massa cefalopediosa do limneídeo em questão não foram demonstradas.

Em condições de estresse fisiológico, como o parasitismo, gastrópodes ativam vias metabólicas direcionadas a manutenção da sua homeostase. Thompsom e Lee (1986) verificaram que *Biomphalaria glabrata* submetidas a períodos de jejum e a infecção por *Schistosoma mansoni* mantiveram os níveis de glicose constantes na hemolinfa. Assim, é notável a presença de mecanismos homeostáticos estabelecido entre tecidos e hemolinfa voltados à manutenção da glicemia (TUNHOLI *et al.*, 2011b).

Sabe-se que a infecção por larvas de trematódeos e nematóides promove severas alterações fisiológicas no organismo de moluscos hospedeiros, relacionadas tanto ao metabolismo de carboidratos quanto de proteínas. Tunholi *et al.* (2017a) evidenciaram que o estabelecimento de um balanço energético negativo em *L. columella* se deu em virtude das demandas energéticas de *H. baujardi* e de seu simbionte *Photorhabdus* sp., fazendo com que o molusco hospedeiro esgotasse suas reservas polissacarídicas, impondo a este a necessidade de acionar vias bioquímicas alternativas relacionadas a produção de ATP. Nesta condição, o caramujo demonstra a capacidade de utilizar proteínas como substrato energético (BECKER, 1980). Assim, o decréscimo nos conteúdos de proteínas totais na hemolinfa de *P. columella* parasitadas por *H. baujardi*, LPP7, ratifica a capacidade destes hospedeiros em utilizarem estruturas carbonadas obtidas de aminoácidos gliconeogênicos como fonte de energia. Condição similar tem sido verificada por outros autores (PINHEIRO *et al.*, 2003; TUNHOLI *et al.*, 2010) e evidenciada pelas alterações de ALT e AST.

No presente estudo, aumento significativo nos conteúdos de ácido úrico foi observado após a primeira e segunda semana de exposição, indicando ser este o período de maior estresse ao hospedeiro. Este cenário fisiológico indica uma interessante flexibilidade metabólica do molusco em resposta a exposição, já que o

ácido úrico é um metabólito menos tóxico para moluscos aquáticos e pode atuar como anti-oxidante não-enzimático (BECKER, 1983; MELLO-SILVA, 2010). Como consequência do processo de desaminação de aminoácidos, produtos nitrogenados de degradação são formados, como ureia e ácido úrico, favorecendo o aumento de suas concentrações séricas em gastrópodes, sob condições de estresse fisiológico (BECKER, 1983; TUNHOLI *et al.*, 2011b).

Em paralelo, a exposição de *H. baujardi*, LPP7 em *P. columella* induziu aumento na intensidade de reações fermentativas, como aquelas catalisadas pela LDH, resultando na transição do metabolismo aeróbio para anaeróbio. Resultado similar tem sido apresentado por Tunholi-Alves *et al.* (2018), estudando a interface *Achatina fulica/Angiostrongylus cantonensis*, na qual demonstraram que a infecção pelo nematoide além de induzir aumento nos níveis de lactato e redução nos conteúdos de piruvato hemolinfático, resultou na inibição de centros oxidativos ligados ao ciclo do ácido tricarboxílico do hospedeiro. Assim, mesmo que energeticamente desfavorável ao molusco, esta condição faz-se necessária, a fim de assegurar a manutenção do balanço redox do mesmo, garantindo, mediante a reoxidação do NADH, a utilização de novas moléculas de glicose como fonte de carbono, abastecendo importantes vias celulares.

Alterações nas atividades hemolinfáticas das aminotransferases (ALT e AST) de *P. columella* infectadas por *H. baujardi*, LPP7, foram verificadas após a primeira e segunda semanas de experimento. A alanina aminotransferase (ALT) é considerada um biomarcador de injúria tecidual, localizada tanto no citosol como em mitocôndrias de células de vertebrados e invertebrados. Assim, o aumento de sua atividade sérica indica lesões celulares, induzidas por processos inflamatórios e/ou necróticos em tecidos, provavelmente relacionados a exposição ao nematoide. Já, a aspartato aminotransferase (AST) é uma isoenzima presente no citosol das células e sua função pode estar associada a ALT (THRALL, 2015).

Pinheiro, Gomes e Chagas (2001), estudando o efeito da infecção por *Eurytrema coelomaticum* em *Bradybaena similaris*, também notaram elevação das atividades das aminotransferases no hospedeiro intermediário. Segundo estes autores, tais alterações provavelmente decorrem do aumento da gliconeogênese, onde observa-se maior consumo de estruturas carbonadas a partir de aminoácidos, redução das concentrações de proteínas totais e acúmulo de produtos nitrogenados de excreção em moluscos expostos. Neste contexto, pode se afirmar que situação

similar pode estar ocorrendo na interface *P. columella*/*H. baujardi*, LPP7, no qual o aumento na atividade da ALT e AST pode estar associada ao aumento da demanda energética do hospedeiro, resultando na mobilização de potenciais fontes energéticas, como aminoácidos.

5.2 Avaliação da taxa de mortalidade e da biologia reprodutiva de *P. columella* expostas a *H. baujardi* LPP7

A mortalidade não foi um achado representativo para o presente estudo, embora isso não anula o fato da relação *H. baujardi*/*P. columella* ter acontecido, levando em consideração a quantidade de NEPs utilizada (75 JI/mL). No estudo realizado por Tunholi *et al.* (2017a) a exposição do limneídeo ao NEP resultou em uma taxa de mortalidade de 66,66% e todos os parâmetros reprodutivos foram alterados em decorrência da infecção, demonstrando a ocorrência do fenômeno de castração parasitária em *L. columella*. Diferentemente, a abordagem do presente estudo variou quando comparada a de Tunholi *et al.* (2017a), no aspecto dosagem de JIs de *H. baujardi* LPP7 utilizada, que em média foi 200x maior (15000 JI/mL); em relação ao presente estudo (75 JI/mL); levando a considerar a taxa de mortalidade, que pode ser relacionada a quantidade de NEPs utilizada, sugerindo uma relação diretamente proporcional. Além disso Zimmermann, Luth e Esch (2013), encontraram por infecção natural a presença de nematoides de vida livre *Daubaylia potomaca* em planorbídeos contendo em média 108 nematoides infectando os caramujos, sendo esta quantidade próxima a utilizada no presente estudo (112,5 JI/mL). A relação nematoide/caramujo pode ser classificada como diretamente proporcional, comparando com estudos citados acima, ou seja, quanto maior quantidade de nematoides utilizados, há mais chance de aumento de mortalidade e alterações que se mantém ao longo da avaliação (TUNHOLI *et al.*, 2017a), e a menor quantidade de nematoides utilizadas, pode demonstrar uma relação natural que pode ocorrer no ambiente e auxiliar o entendimento da relação nematoide/caramujo. Outro ponto importante, é a questão do tempo de exposição ao nematoide, pois 24 horas de exposição pode ser considerado pouco tempo para que o nematoide consiga se desenvolver e realizar sua reprodução e desenvolvimento pleno, como visto por Zimmermann, Luth e Esch (2013), que verificou os padrões de ação do nematoide no

hospedeiro (caramujo), para determinar os mecanismos que ocorrem. Nos quais foram vistos que, os nematoides podem detectar que o hospedeiro pode estar morrendo e sair para o ambiente a procura de um novo hospedeiro, além da quantidade de nematoides no hospedeiro, pode induzir a saída dos mesmos mais cedo, sugerindo uma competição por recursos. Definido como uma relação complexa de detecção da morte do hospedeiro, competição e maturação dos nematoides (ZIMMERMANN; LUTH; ESCH, 2013).

A exposição experimental de *P. columella* a JI de *H. baujardi* LPP7 resultou em alterações significativas na biologia reprodutiva do hospedeiro, caracterizada pelo decréscimo precoce no número de ovos postos e massas ovíferas durante a primeira semana de exposição. Na esfera reprodutiva, o fenômeno da castração parasitária tem sido comumente mencionado (LAFFERTY; KURIS, 2009; TUNHOLI-ALVES *et al.*, 2011a). Segundo Baudoin (1975), esse processo é caracterizado por uma supressão nos parâmetros reprodutivos, tendo sua causa associada a dois possíveis mecanismos: a) direto, quando se observa danos em estruturas gonadais do hospedeiro decorrentes a ação mecânica imposta por estágios parasitários; b) indireto, caracterizado mediante depleção nas concentrações de reservas energéticas do organismo parasitado. Diante do apresentado, parece claro que o processo de castração parasitária caracterizada no modelo estudado decorre de forma precocemente, definidos por duas principais formas, tanto a partir de mecanismos indiretos, como consequência ao comprometimento do status energético do hospedeiro, quanto diretos, já que importantes desorganizações celulares foram evidenciadas nos tecidos gonadais do molusco em questão.

Condição contrária a relatada foi reportada por Tunholi-Alves *et al.* (2011a) que observou a diminuição dos parâmetros reprodutivos de *B. glabrata* quando parasitadas por *A. cantonensis*. Segundo tais autores, a infecção pelo metastrogilídeo comprometeu progressivamente a performance reprodutiva do planorbídeo, em resposta única e exclusiva ao esgotamento das reservas energéticas do molusco hospedeiro. De forma similar, Tunholi *et al.* (2017a) corroboram com os resultados de Tunholi-Alves *et al.* (2011a) e demonstram que o comprometimento reprodutivo de *P. columella* infectados por *H. baujardi* LPP7, estabeleceu mediante a intensa demanda energética do nematoide que compete diretamente com as do molusco para suprir suas necessidades metabólicas, prejudicando o *status* metabólico geral do hospedeiro. Além disso, diferentemente, a abordagem do presente estudo variou

quando comparada a de Tunholi *et al.* (2017a). Além da mortalidade, já citada, outros aspectos divergiram, nos quais, a dosagem de JIs de *H. baujardi* LPP7 e foram realizados alguns testes bioquímicos, detalhando o efeito da interação entre molusco/nematoide, no qual foi o principal foco do presente trabalho; e por fim, as alterações histológicas puderam ser evidenciadas com maior clareza, notadas mediante a implementação de diferentes técnicas de coloração.

5.3 Alterações histopatológicas em *P. columella* expostas a *H. baujardi* LPP7

Para melhor compreender a relação parasito-hospedeiro, bem como ratificar a susceptibilidade do limneídeo a exposição de *H. baujardi* LPP7, análises histopatológicas indicaram que a exposição ao NEP culminou em desarranjos celulares importantes em *P. columella*. Esses foram representados na forma de um infiltrado hemocitário na glândula digestiva, em decorrência ao deflagramento de um processo inflamatório, contribuindo para a perda da função do órgão em questão, ocorrendo principalmente na 1ª semana. A glândula digestiva cumpre um papel importante no metabolismo energético e de excreção de componentes no molusco hospedeiro, e a formação de um agregado hemocitário, pode ter contribuído possivelmente pela presença do nematoide, pelo favorecimento de disfunções no armazenamento de glicose e de outros componentes, alterando o funcionamento biológico e contribuindo para a perda da homeostase.

Além disso, foram observadas alterações diretas na glândula reprodutiva, havendo diminuição das células femininas e masculinas, culminando em um déficit na produção, desenvolvimento e postura dos espécimes expostos ao nematoide, observado ao longo das duas primeiras semanas de análise. Houve ainda, degeneração no manto, ocorrendo na terceira semana, levando a crer que a interação entre *P. columella* e *H. baujardi* LPP7 prejudicou o desenvolvimento e manutenção tecidual do molusco. Estes resultados estão de acordo com àqueles previamente publicados por Zbikowska (2003), Mostafa (2007), Tunholi-Alves *et al.* (2014, 2015) e Tunholi *et al.* (2017a), nos quais demonstraram que as infecções por helmintos levaram intensa desorganização celular, especialmente ao nível de glândula digestiva e massa cefalopédica do molusco hospedeiro, caracterizada pela proliferação de hemócitos e expansão de matriz extracelular, favorecendo o processo de perda dos

constituintes normais dos tecidos afetados, contribuindo para a quebra da homeostase fisiológica e reprodutiva dos moluscos em questão.

5.4 Microscopia eletrônica

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) oferece uma contribuição importante na visualização das estruturas externas dos órgãos. Nos registros realizados pela MEV, foram observados a descrição topográfica dos órgãos que integram a massa visceral do molusco hospedeiro, sendo esta constituída pela glândula digestiva, glândula albuminosa e massa cefalopediosa. Os resultados demonstraram similaridade com o que foi observado na histopatologia. Com excessão, foi registrado a diminuição no tamanho da glândula albuminosa em moluscos expostos ao nematoide quando comparando aos não expostos. Adicionalmente, proliferação e deposição de matriz extracelular, indicando ocorrência de um processo de cicatrização por substituição de tecido conjuntivo, na glândula digestiva, foi verificado na posição antero-medial da mesma na terceira semana de avaliação. Tais alterações podem estar associadas a passagem de J1 de *H. baujardi* LPP7 pelos órgãos em questão, uma vez que tais estádios guarnecem de um dente córneo que os permitem lacerar e perfurar os tecidos do hospedeiro, especialmente em regiões mais delgadas e flexíveis (FORST e CLARKE, 2002).

Pinheiro, Amato e Lanfredi (2009) descreveram que a glândula digestiva de moluscos gastrópodes é tida como local de predileção para o desenvolvimento larval de helmintos. Assim, a laceração visualizada na superfície da glândula digestiva de *P. columella* pode ser explicada pelo comportamento migratório do nematoide, induzindo neste órgão reações de reparação tecidual. Entretanto, não foram encontrados na literatura pesquisada, estudos que relatassem o uso da MEV para análise ultra estrutural de moluscos gastrópodes, sendo este resultado pioneiro.

Foi demonstrada notória influência dessa relação para a biologia dos caramujos, levando ao enriquecimento sobre a ação dos NEPs. A partir dos modelos experimentais do presente estudo, no futuro será possível propor estratégias de controle relacionados aos impactos que a fasciolose e demais doenças a partir de caramujos têm para a saúde única.

6. CONCLUSÕES

A exposição de *Pseudosuccinea columella* a *Heterorhabditis baujardi* LPP7 interveio nas funções substanciais do organismo, demonstrando alterações fisiológicas, reprodutivas e teciduais precoces nos moluscos.

Os efeitos da exposição foram demonstrados de forma direta e indireta, sendo que os mecanismos indiretos foram bastante significativos por reduzirem as reservas energéticas e utilizarem vias a partir de proteínas e alternativas para o metabolismo de carboidratos, também, aumento de enzimas relacionadas a danos teciduais e acúmulo de produtos nitrogenados de degradação. Essa relação interferiu em toda a biologia hemolinfática do caramujo, influenciando diretamente em suas funções reprodutivas, demonstradas pelo mecanismo de castração precoce e temporária, além de injúrias teciduais registradas em *P. columella* exposta a *H. baujardi* LPP7, que teve ação na 1ª e 2ª semana e teve reestabelecimento na 3ª semana de avaliação, ratificando a susceptibilidade deste gastrópode ao NEP.

Com isso, essa relação demonstra-se experimentalmente funcional para potencialmente ser usada como ferramenta alternativa e potencial no controle biológico desta espécie de limneídeo.

7. REFERÊNCIAS

- ADAMS, B.J., *et al.* Biodiversity and systematics of nematode-bacterium entomopathogens. **Biology Control**, v.37, p.32-49, 2006.
- ADEMA, C.M.; LOKER, E.S. Digenean-gastropod host associations inform on aspects of specific immunity in snails. **Developmental & Comparative Immunology**, v.48, p.275-283, 2015.
- AKHURTS, R.J.; BOEMARE, N.E. Biology and Taxonomy of *Xenorhabdus*. In: Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. eds. GAUGLER, R. e KAYA, H.K. Press Inc. Boca Raton, Florida, p. 75-87, 1990.
- ALEIXO, M.A.; FREITAS, D. F.; DUTRA, L.; MALONE, J; MARTINS, I. V. F.; MOLENTO, MB. *Fasciola hepatica*: epidemiology, perspectives in the diagnostic and the use of geoprocessing systems for prevalence studies. **Seminário Ciências Agrárias (Online)**, v. 36, p. 1451, 2015.
- ALMENARA, D.P, *et al.* Nematoides Entomopatogênicos. Tópicos Avançados em Entomologia Molecular, INCTEM, v.16- p.1-40, 2012.
- ALVAREZ-MERCADO, J.M., IBARRA-VELARDE, F., ALONSO-DIAZA, M.A., VERA-MONTENEGRO, Y., AVILA-ACEVEDO, J.G., GARCIA-BORES, A.M. In vitro antihelmintic effect of fifteen tropical plant extracts on excysted flukes of *Fasciola hepatica*. **BMC Veterinary Research**. 2015.
- ALVES, D.P. *et al.* Distribution and factors associated with *Fasciola hepatica* infection in cattle in the south of Espírito Santo State, Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v.17, p.271-276, 2011.
- BARCI, L.A, *et al.* Compatibilidade de isolados de *Beauveria bassiana* (Ascomycetes: Clavicipitaceae) com carrapaticidas químicos utilizados no controle do carrapato dos bovinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.18, p.63-68, 2009.
- BAUDOIN, M. Host Castration as a parasitic strategy. *Evolution*. v.29, p.335-352, 1975.
- BECKER, W. Metabolic interrelationships of parasitic trematodes and molluscs, especially *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v. 63, p. 101-111.1980
- BECKER, W. Purine metabolism in *Biomphalaria glabrata* under starvation and infection with *Schistosoma mansoni*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, V.76B, p. 215-219, 1983.
- BISHOP, S.H.; ELLIS, L.L.; BURCHAM, J.M. Aminoacid metabolism on molluscs. In **The Mollusca. Metabolic Biochemistry and Molecular Biomechanics**, v.1, Academic Press, New York-USA, p. 237-243, 1983.

BOEMARE, N.E.; AKHURST, R.J.; MOURANT, R.G. DNA relatedness between *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae), symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes, and a proposal to transfer *Xenorhabdus luminescens* to a new genus, *Photorhabdus* gen. nov. **International Journal Systematic Bacteriology**. v.43, n.2, p.249-255, 1993.

BOWMAN, D. D. **Georgis' Parasitology for Veterinarians**. 10. ed. St Louis: Elsevier Health Sciences, 477p., 2014.

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

BRASIL. Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica: diretrizes técnicas: Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose (PCE. 2. ed. – Brasília, DF. Editora do Ministério da Saúde, 2008.

CANTANHEDE, S.P.D. *et al.* Atividade moluscicida de plantas: uma alternativa profilática. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n.2, p. 282-288, 2010.

CARDOSO, R, *et al.* Effect the entomopathogenic nematode *Steinernema glaseri* (Rhabditida: Steinernematidae) isolate Santa Rosa on the biological parameters of engorged nymphs of *Amblyomma cajennenses* (Acari: Ixodidae). **Arquivo Instituto Biológico**, São Paulo, v.80, n.2, p.237-241, 2013.

CARVALHO, C.M. Revisão taxonômica e elaboração de mapas de distribuição geográfica de espécies brasileiras da família Lymnaeidae Rafinesque, 1815 (Gastropoda, Basommatophora), 115f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Programa de pós-graduação em Ciências da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2014.

CASTRO, L.S. *et al.* Ovicidal potential of *Pochonia chlamydosporia* isolate Pc-10 (Ascomycota: Sordariomycetes) on egg masses of the snail *Pseudosuccinea columella* (Mollusca: Gastropoda). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.166, p. 107-212, 2019.

CICHE, T.A.; ENSIGN, J.C. For the insect pathogen *Photorhabdus luminescens*, wick end of a nematode is out? **Applied Environmental Microbiology**. **69**, 890-897, 2003.

CONNERTY, H.; BRIGGS, A.R.; EATEN, E.H. Determination of blood urea nitrogen using a simple stabilizing reagent. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 25, n.11, p.1321-1325, 1955.

COSTA, V.M.M; SIMÕES, S.V.D; RIET-CORREA, F. Gastro-intestinal nematodes control in goats and sheep in the semiarid region northeastern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.1, p. 65-71, 2011.

DE SOUZA, R.M. *et al.* The Influence of starvation and *Eurytrema coelomaticum* infection on the nitrogenous products of degradation in the hemolymph of *Bradybaena similaris*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.43, p.365–371, 2000.

DOLINSKI, C. Nematoides como agentes do controle biológico de insetos. In: OLIVEIRA FILHO, E.C.; MONNERAT, R.G. **Fundamentos para regulação de semioquímicos, inimigos naturais e agentes microbiológicos de controle de pragas**. Brasília: EMBRAPA, p. 1-10, 2006.

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

FAIRWEATHER, I. Reducing the future threat from (liver) fluke: realistic prospect or quixotic fantasy. **Veterinary Parasitology**. v. 180, p. 133-143, 2011.

FERNANDEZ, M.A. *et al.* **Moluscos Límnicos Invasores no Brasil: biologia, prevenção, controle**, Chapter: Gastrópodes límnicos invasores: morfologia comparada, Publisher: Redes Editora, pp.125-136, 2012.

FORST, S.; CLARKE, D. J. Nematode-bacterium symbiosis. In: **Entomopathogenic Nematology**, ed. Gaugler, R. CABI Publishing, Wallingford, UK, p. 57-77, 2002.

FURTADO, F.H.S., *et al.* Expansão de *Lymnaea columella* (SAY, 1817), molusco transmissor da fasciolose, no maciço de Baturité, estado do Ceará. **Cadernos ESP**, Ceará v.9, n.2, p. 62-66, jul/dez. 2015

GAUGLER, R. Ecological considerations in the biological control of soil inhabiting insects with entomopathogenic nematodes. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v.24, p.351-360, 1988.

GEDEN, C.J.; AXTELL, R.C.; BROOKS, W.M. Susceptibility of the house fly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae), to the entomogenous nematodes *Steinernema feltiae*, *S. glaseri* (Steinernematidae), and *Heterorhabditis heliothidis* (Heterorhabditidae). **Journal Medical Entomology**, v.23, n.3, p. 326-332, 1986.

GEORGIS, R.; POINAR JUNIOR, G. O. Field effectiveness of entomophilic nematodes *Neoaplectana* and *Heterorhabditis*. In: LESLIE, A. R.; METCALF, R. L. (Eds.). **Integrated pest management for turfgrass and ornamentals**. Boca Raton: CRC. p. 213-224, 1989.

GEORGIS, R. Formulation and application technology. In: **Entomopathogenic Nematodes in Biological Control**. eds. GAUGLER, R. e KAYA, H.K. Press Inc. Boca Raton, Florida. p. 173-214, 1990.

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

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

GORSUCH, A.M. Regulations for the enforcement of the Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide act exemption from regulation of certain biological control agents. **Federal Register**, n.47, p. 928-930, 1982.

GREWAL, P.; DE NARDO, E.A.B.; AGUILLERA, M.M. Entomopathogenic nematodes: potential for exploration and use in South America. **Neotropical Entomology**, n.30, p.191-205, 2001.

HAZIR, S, *et al.* Entomopatogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for biological control of soil pests. **Turkish Journal of Biology**, v.27, p.181-202, 2003.

JACOBS, D. *et al.* Platyhelminthes ('flatworms'). In: JACOBS, D. *et al.* **Principles of Veterinary Parasitology**. 1. ed. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, v.1, capítulo. 5, p. 285-356, 2015.

KANAPALA, V.K.; ARASADA, S.P. Histopathological Effect of Paraquat (Gramoxone) on the Digestive Gland of Freshwater Snail *Lymnaea luteola* (Lamarck:1799) (Mollusca: Gastropoda). **International Journal of Scientific Research in Environmental Sciences**, v.1, n.9, p.224-230, 2013.

KAYA, H.K.; GAUGLE, R. Entomopathogenic nematodes. Ann. **Revista Entomologia**, v.38, p.181-206, 1993.

KAYA, H. K.; STOCK, S. P. Techniques in insect nematology. In: LACEY, L. A. (Ed.) Manual of techniques in insect pathology. San Diego: Academic Press. **Biological Techniques**. p.281-324, 1997.

KAPLAN, L.A.; PESCE, A.J. **Clinical chemistry**, Thirdth ed. Mosby, St. Lous, 1996.

KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cellular Biology**, v.27, p. 137-138, 1965.

KELLEY, J. M. *et al.* Current threat of triclabendazole resistance in *Fasciola hepatica*. **Trends in parasitology**, v. 32, n. 6, p. 458-469, 2016.

KING, C.H.; BERTSCH, D. Historical perspective: Snail control to prevent schistosomiasis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.9, n.4, p. 1-6, 2015. Doi: doi.org/10.1371/journal.pntd.0003657.

KOPPENHÖFER, A.M., *et al.* Comparison of neonicotinoid insecticides as synergists for entomopathogenic nematodes. **Biological Control**, v.24, p.90-97, 2002.

KOPPENHÖFER, A.M.; GREWAL, P.S. Compatibility and interaction with agrochemicals and biocontrol agents. In: GREWAL, P.S.; EHLERS, R.U.; SHAPIRO, D.I. **Nematodes as biocontrol agents**. CABI: Publishing Cambridge, p.364-381, 2005.

LAFFERTY, K.D.; KURIS, A.M. Parasitic castration: the Evolution and ecology of body snatchers. **Trends in Parasitology**. v. 25, n.12, p.564-572, 2009. Doi: 10.1016/j.pt.2009.09.003.

LEAL, L.C.S.R., *et al.* Potential of entomopathogenic nematodes of the genus *Heterorhabditis* for the control of *Stromoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). **Brazilian Journal Veterinary Parasitology**, Jaboticabal, v. 26, n. 4, p. 451-456, oct.-dec. 2017.

LEITE, L. G. Nematoides entomopatogênicos. In: BATISTA FILHO, A. (Ed.). Controle biológico de insetos e ácaros. São Paulo: **Instituto Biológico (Boletim técnico)**, n. 15- p.42-51, 2006.

LOCKYER, A.E, *et al.* Trematodes and snails: An intimate association. **Can J Zool**, v. 82, p.251-269, 2004.

LUNA, L.G. **Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. 3.ed. New York: McGraw-Hill, 258p., 1968.

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

MAHMOUD, M.F.; MANDOUR, N.S.; POMAZKOV, Y.I. Efficacy of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* Cross N 33 against larvae and pupae of four fly species in the laboratory. **Nematology Mediterraneo**, v. 35 n.2, p.221-226, 2007.

MARQUES, S.M.T., SCROFERNEKER, M.L. *Fasciola hepatica* infection in cattle and buffaloes in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Parasitología Latinoamericana**, v.58, n.3-4, p.169-172, 2003.

MATTOS, M.J.T., *et al.* Seasonal occurrence and bioecology of *Lymnaea columella* Say, 1817 (Mollusca, Lymnaeidae) in its natural habitat in Rio Grande do Sul, **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.19, p.248-252, 1997.

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

MELLO-SILVA, C.C.; VILAR, M.M.; VASCONCELLOS, M.C.; PINHEIRO, J.; RODRIGUES, M.L.A. Carbohydrate metabolism alterations in *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni* and exposed to *Euphorbia splendens* var. hislopilii látex. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, n. 4, p. 492-495. 2010

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

MONTEIRO, C.M.O., *et al.* *Heterorhabditis amazonensis* (Rhabditidae: Heterorhabditidae), strain RSC-5, for biological control of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v.106, n.4, p. 821- 826, 2010.

MONTEIRO, C.M.O. Controle de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) com nematoides entomopatogênicos: aplicação em formulação inseto cadáver e compatibilidade com outros agentes de controle. 175f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; Seropédica, 2014.

MOORE, M.N.; HALTON, D.W. Histochemical change in the digestive gland of *Lymnaea truncatula* infected with *Fasciola hepatica*. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v.43, p.1–16, 1973.

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

NGUYEN, K.B.; SMART JR, G.C. Life cycle of *Steinernema scapterisci* (Nguyen & Smart, 1990). **Journal Nematology**. v.24, p.160-169, 1992.

PARAENSE, W. L. *Lymnaea viatrix* and *Lymnaea columella* in the neotropical region: a distributional outline. The Schistosome Vectors in the Americas. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, V. 77, p. 181-188, 1982.

PETERS, A. The natural host range of *Steinernema* and *Heterorhabditis* spp. and their impact on insect populations. **Biocontrol Science and Technology**, v.6, p.389-402, 1996.

PIERCE, L.R. Efficacy of entomopathogenic nematodes utilized for control of stable flies (*Stomoxys calcitrans*) at round bale feeding sites [dissertation]. Stillwater: Oklahoma State University; 2012.

PILE, E.A. *et al.* Dinâmica de *Lymnaea columella* (Say, 1817), hospedeiro intermediário de *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) em municípios do Estado de São Paulo, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 35, n. 4, p. 151-155, 1998.

PINHEIRO, J., GOMES, E.M. A method for glycogen determination in molluscs. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 37, p. 569–576, 1994.

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

PINHEIRO, L. *et al.* Estudo fitoquímico e avaliação da atividade moluscicida da *Kielmeyera variabilis* Mart (Clusiaceae). **Química Nova**, v. 26, n. 2, p. 157-160, 2003.

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

POINAR, G.O. Taxonomy and biology of *Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*. In: GAUGLER, R.; KAYA, H.K. Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. p. Press Inc. Boca Raton, Florida, p. 23-60, 1990.

POPIEL, I; HOMINICK, W. M. Nematodes as biological control agents: part II. **Advances in Parasitology**. v.31, p. 381-431, 1990.

PRAKASH, V.; SINGHAL, K.C., GRUPTA, RR. Anthelmintic activity of *Punica Granatum* L. and *Artemisia silversiana*. **Indian Journal of Pharmacology**, p.12: 62, 1980.

RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. Zoologia dos invertebrados: uma abordagem funcional-evolutiva. São Paulo: Roca, 2005. p. 884-899.

SANTOS, G. S.; PÁDUA, L. E. Flutuação populacional e espécies de moscas-das-frutas em citrus na cidade de Teresina – PI. **Caatinga**, v.17, p. 87-92, 2004.

SILVA, E.R., *et al.* Action of *Heterorhabditis indica* (Rhabditida: Heterorhabditidae) strain LPP1 on the reproductive biology of engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Biologic Control**, v.62, n.3, p. 140-143, 2012.

TAIR-ABBACI, K. *et al.* Anatomical and histological characterization of the gametogenesis of *Radix balthica* (Linnaeus, 1758) in comparison with *Lymnaea stagnalis* (Linnaeus, 1758). **Journal of Histology & Histopathology**, v.4, n.5, 2017.

TAYLOR, D.B., *et al.* Susceptibility of house fly (Diptera: Muscidae) larvae to entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae). **Environmental Entomology**, v.27, n.6, p.1514-1519, 1998.

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*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.72, p.417–421, 1986.

THRALL, M.A. 2015. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 2ª ed. Roca, São Paulo, 678p.

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

TUNHOLI-ALVES, V.M. *et al.* Lipid levels in *Biomphalaria glabrata* infected with different doses of *Echinostoma paraensei* miracidia. **Experimental Parasitology**, v.128, p.212–216, 2011b.

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

TUNHOLI-ALVES, V.M. *et al.* Activation of anaerobic metabolism in *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Gastropoda) experimentally infected by *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda, Metastrongylidae) by high-performance liquid chromatography. **Parasitology International**, v.63, p.64-68, 2014.

TUNHOLI-ALVES, V.M. *et al.* Biochemical profile of *Achatina fulica* (Mollusca: Gastropoda) after infection by different parasitic loads of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda, Metastrongylidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.124, p.1-5, 2015.

TUNHOLI-ALVES, V. M. *et al.* Unveiling the oxidative metabolism of *Achatina fulica* (Mollusca: Gastropoda) experimentally infected to *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongylidae). **Parasitology Research**, v.117, p:1773–1781, 2018.

TUNHOLI, V.M. *et al.* 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. 2010.

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

TUNHOLI, V.M. *et al.* Influence of *Echinostoma paraensei* (Lie and Basch, 1967) infection on the calcium content in *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Experimental Parasitology**, v. 129, p. 266-269. 2011b.

TUNHOLI, V.M., *et al.* Physiological alterations in *Bradybaena similaris* (Stylommatophora: Bradybaenidae) induced by the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis indica* (Rhabditida: Heterorhabditidae) strain LPP1. **Experimental Parasitology** n.139, p. 8-12, 2014.

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

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

VIAJAYA, K.K.; PRIYADARSINI, A.S. Histology and Histochemistry of Mantle of *Lymnaea luteola* (Lamarck 1799) Mollusca Gastropoda, **Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v.9, n.6, p. 28-31, 2014.

VIDAL, M.L.B. *et al.* Efeitos de óleos essenciais no controle de moluscos transmissores de fasciolose. Tópicos especiais ciência animal VII [recurso eletrônico] Alegre,ES: CAUFES, Cap.11, p.157-167, 2018a.

VIDAL, M.L.B. *et al.* Nematoides entomopatogênicos: agentes promissores no controle biológico de parasitos. Tópicos especiais ciência animal VII [recurso eletrônico] Alegre,ES: CAUFES, Cap.13, p.188-197, 2018b.

VIDAL, M.L.B. *et al.* Caracterização de metodologias aplicadas no estudo bioquímico e sistemático de *Pseudosuccinea columela* (Mollusca: Gastropoda) (Say, 1817). Tópicos especiais ciência animal VIII [recurso eletrônico] Alegre,ES. CAUFES, Cap. 9, p. 153-166, 2019.

WEICHSELBAUM, T.E. An Accurate and Rapid Method for the Determination of Proteins in Small Amounts of Blood, Serum and Plasma. **American Journal of Clinical Pathology**, 16, 40-49, 1946.

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

ZIMMERMANN, M.R.; LUTH, K.E.; ESCH, G.W. Shedding Patterns of *Daubaylia potomaca* (Nematoda: Rhabditida). **Journal of Parasitology**, V.99, N.6, p. 966-969, 2013. Doi: <http://doi.org/10.1645/13-260.1>.