

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

NATÂNIA DO CARMO SPERANDIO

ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E REPRODUTIVAS DE *Pseudosuccinea columella* (BASOMATOPHORA: LYMNAEIDAE) FRENTE A INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 (RHABDITIDA: HETERORHABDITIDAE)

ALEGRE-ES

2022

NATÂNIA DO CARMO SPERANDIO

ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E REPRODUTIVAS DE *Pseudosuccinea columella* (BASOMATOPHORA: LYMNAEIDAE) FRENTE A INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 (RHABDITIDA: HETERORHABDITIDAE)

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: Prof^a. Dr^a. Isabella Vilhena Freire Martins

Coorientador: Prof. Dr. Victor Menezes Tunholi Alves

ALEGRE-ES

2022

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

S749a Sperandio, Natânia do Carmo, 1995-
Alterações fisiológicas e reprodutivas de *Pseudosuccinea columella* (Basomatophora: Lymnaeidae) frente a infecção experimental por *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 (Rhabditida: Heterorhabditidae) / Natânia do Carmo Sperandio. - 2022.

76 f. : il.

Orientadora: Isabella Vilhena Freire Martins.

Coorientador: Victor Menezes Tunholi.

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

1. Moluscicidas. 2. Sistemas de controle biológico. I. Martins, Isabella Vilhena Freire. II. Tunholi, Victor Menezes. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. IV. Título.

CDU: 619

NATANIA DO CARMO SPERANDIO

ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E REPRODUTIVAS DE *Pseudosuccinea columella* (BASOMATOPHORA: LYMNAEIDAE) FRENTE A INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 (RHABDITIDA: HETERORHABDITIDAE)

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 parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Diagnóstico e Terapêutica das Enfermidades Clínico-Cirúrgicas.

Aprovado em 21 de fevereiro de 2022.

COMISSÃO EXAMINADORA



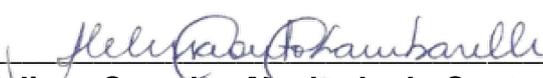
Prof^a. Dr^a. Isabella Vilhena Freire Martins
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora



Prof. Dr. Victor Menezes Tunholi Alves
Faculdade Multivix
Coorientador



Prof. Dr. Vinicius Menezes Tunholi-Alves
Universidade Estácio de Sá - UNESA



Prof^a. Dr^a. Melissa Carvalho Machado do Couto Chambarelli
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sua infinita bondade, benção e permissão para que tudo se realizasse.

À minha família por todo amor, apoio e incentivo para seguir em frente, mesmo com a saudade da ausência física. Ao Higor Assis, meu companheiro de vida que me acompanhou e acompanha na luta para conquistarmos nossos objetivos. À família que escolhi e que me acolheu em Alegre: Eva Lúcia, Heraldo, Verônica, Sebastião, Amanda e família, tenho profunda gratidão por tudo.

À minha orientadora, Isabella e meu coorientador Victor, pela confiança, ensinamentos e companheirismo, a professora colaboradora Jankerle, pelas contribuições e aporte de sempre, com certeza sempre farão parte de minhas lembranças e imenso agradecimento.

A todos os meus colegas de laboratório que contribuíram para que tudo desse certo, Lais, Amanda, Matheus, Jason e Pedro.

Agradeço a Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) por ter sido minha morada por bons sete anos. À Faculdade Multivix pela parceria com o laboratório de Biologia Celular e Molecular, do Departamento de Ciências Farmacêuticas. À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES), pela contribuição financeira.

À Melissa Chambarelli e Carol, por terem cedido os nematoides para pesquisa, assim como a Emilly na figura do laboratório de NUDEMAFI com os exemplares de *Tenebrio molitor*.

Agradeço aos professores Vinícius e Melissa por ter aceito participar da minha banca e contribuir para a concretização desta pesquisa.

Por fim, a todos que contribuíram de alguma forma com meu crescimento profissional ou pessoal, muito obrigada.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES).

RESUMO

SPERANDIO, NATÂNIA DO CARMO. **ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E REPRODUTIVAS DE *Pseudosuccinea columella* (BASOMATOPHORA: LYMNAEIDAE) FRENTE A INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 (RHABDITIDA: HETERORHABDITIDAE)**, 2022. 76 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Centro de Ciências Agrárias e Engenharias – CCAE, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2022.

O molusco *Pseudosuccinea columella* atua como hospedeiro intermediário (HI) obrigatório no ciclo de *Fasciola hepatica*, trematoda responsável pela fasciolose, doença que acomete o fígado e ductos biliares de diversos mamíferos, em destaque os animais de produção e os humanos. Neste sentido, são crescentes os estudos que buscam o controle eficaz, seja no hospedeiro vertebrado, agindo no parasito adulto, seja no HI, comprometendo o desenvolvimento dos estágios larvais do helminto. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar, sob condições laboratoriais, a susceptibilidade de *P. columella* frente a concentração de 150 Juvenil infectante de *H. bacteriophora* HP88/molusco, expostos por 24 e 48h, acompanhado dos seus respectivos grupos controle. Após a exposição os moluscos foram avaliados por 21 dias quanto a: mortalidade acumulada; número de ovos postos e taxa de eclodibilidade; alterações bioquímicas, através da mensuração de proteína total (PPT), ureia, ácido úrico, glicose, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e glicogênio; e possíveis alterações histopatológicas. Verificou que a exposição aos nematoides entomopatogênicos (NEPs) induziu alterações bioquímicas importantes, como: redução dos níveis de glicose, PPT e glicogênio, caracterizando o esgotamento das reservas energéticas nestes hospedeiros em decorrência da competição por tais substratos enfrentados pelos nematoides; acúmulo de produtos nitrogenados em consequência da ativação da via aeróbica, em resposta ao balanço energético negativo; além do aumento das enzimas marcadoras de lesão celular. Alcançou-se uma taxa de mortalidade acumulada de 65,52%, no grupo exposto 48h e comprometimento da função reprodutiva, observada pela interferência na eclodibilidade, em relação ao respectivo controle, atrelada as desordens histológicas.

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

ABSTRACT

SPERANDIO, NATÂNIA DO CARMO. **ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E REPRODUTIVAS DE *Pseudosuccinea columella* (BASOMATOPHORA: LYMNAEIDAE) FRENTE A INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 (RHABDITIDA: HETERORHABDITIDAE)**, 2022. 76 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Centro de Ciências Agrárias e Engenharias – CCAE, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2022.

The mollusk *Pseudosuccinea columella* acts as an obligate intermediate host (IH) in the *Fasciola hepatica* life cycle and this fluke is responsible for fasciolosis, a disease that affects the liver and bile ducts of many mammals, especially production animals and humans. In this sense, there are increasing studies that seek effective control, whether in the vertebrate host, acting on the adult parasite, or in the IH, compromising the development of the larval stages of the helminth. Thus, the present study aimed to evaluate, under laboratory conditions, the susceptibility of *P. columella* against the concentration of 150 infective juvenile of *Heterorhabditis bacteriophora* HP88/mollusk, exposed for 24 and 48 hours, accompanied by their respective control groups. After exposure, the mollusks were evaluated for 21 days regarding: accumulated mortality; number of eggs laid and hatchability rate; biochemical changes, through the measurement of total protein (PPT), urea, uric acid, glucose, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and glycogen; and possible histopathological changes. It was found that exposure to entomopathogenic nematodes (EPNs) induced important biochemical changes, such as: reduction of glucose, PPT and glycogen levels, characterizing the depletion of energy reserves in these hosts as a result of competition for such substrates faced by nematodes; accumulation of nitrogenous products as a result of activation of the aerobic pathway, in response to negative energy balance; in addition to the increase in cell injury marker enzymes. A cumulative mortality rate of 65.52% was reached in the group exposed for 48 hours and impairment of reproductive function, observed by interference in hatchability, in relation to the respective control, linked to histological disorders.

Keywords: Biological control. *Lymnaea* sp. Entomopathogenic nematodes (EPNs)

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Classificação de *Pseudosuccinea columella*.....19
- Figura 2- Exemplar de *Pseudosuccinea columella*, evidenciando os aspectos conquiliológicos, seus tentáculos em formato triangular com achatamento e seus olhos compondo o centro da base dos tentáculos.....20
- Figura 3 - Anatomia reprodutiva de *Pseudosuccinea columella*.....21
- Figura 4 - (A) Bebedouro do setor de bovinocultura do Instituto Federal do Espírito Santo – Campus Alegre, com exemplares de *Pseudosuccinea columella*. (B) *P. columella* em aquário da colônia do Laboratório de Parasitologia do Hospital Veterinário da Universidade22
- Figura 5 - Esquema do ciclo de vida dos nematoides entomopatogênicos do gênero *Heterorhabditis* dentro de um inseto.35
- Figura 6 - Fotomicrografia de contraste de interferência de Juvenis Infectantes de *Heterorhabditis*.....36
- Figura 7 - Representação dos processos envolvidos, durante os 21 dias de experimentação. Seleção dos materiais biológicos (moluscos e nematoides entomopatogênicos). Exposição experimental de *Pseudosuccinea columella* a *Heterorhabditis bacteriophora* HP88.....41
- Figura 8 - Relação estabelecida entre as concentrações de proteínas totais (A) ureia (B) e ácido úrico (C) na hemolinfa de *Pseudosuccinea columella* infectada experimental por *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 ao longo de 3 semanas. (a, b) indica que as médias diferem significativamente entre si. $p < 0,0001$52
- Figura 9 - Relação estabelecida entre as atividades da alanina aminotransferase (ALT) (A), aspartato aminotransferase (AST) (B) e cálcio (C) na hemolinfa de *Pseudosuccinea columella* infectada experimental por *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 ao longo de 3 semanas. (a, b) indica que as médias diferem significativamente entre si. $p < 0,0001$54
- Figura 10 - Relação estabelecida entre as concentrações de glicose na hemolinfa (A) glicogênio na glândula digestiva (B) e massa cefalopediosa (C) de *Pseudosuccinea columella* infectada experimentalmente por

Heterorhabditis bacteriophora HP88 ao longo de 3 semanas. (a, b) indica que as médias diferem significativamente entre si. $p < 0,0001$48

Figura 11 - Relação estabelecida entre o número de massa ovígeras (A) Número de ovos (B) e Taxa de eclodibilidade (C) de *Pseudosuccinea columella* infectada experimentalmente por *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 ao longo de 3 semanas. (a, b) indica que as médias diferem significativamente entre si. $p < 0,0001$57

Figura 12 - Fotomicrografia da histopatologia de *Pseudosuccinea columella* em coloração HE (C, E, G, J e L) e PAS (A, B, D, F, H, I e K) evidenciando o Grupo Controle (A, D, E, F, J e K) e Grupo Exposto (B, C, G, H, I e L). 53

LISTA DE SIGLAS E/OU ABREVIATURAS

ALT -	Alanina Aminotransferase
AST -	Aspartato Aminotransferase
<i>F. hepatica</i> -	<i>Fasciola hepatica</i>
JIs -	Juvenis Infectantes
GA -	Glândula Albuminosa
GC -	Grupo Controle
GD -	Glândula Digestiva
GT-	Grupo Exposto
<i>H. bacteriophora</i> -	<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>
HD -	Hospedeiro Definitivo
HI -	Hospedeiro Intermediário
MC -	Massa Cefalopediosa
NEPs -	Nematoides Entomopatogênicos
<i>P. columella</i> -	<i>Pseudosuccinea columella</i>
PTT -	Proteína Total

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 <i>Fasciola hepatica</i> e o cenário da fasciolose no Brasil	16
2.2 Hospedeiro intermediário de <i>Fasciola hepatica</i>	19
2.2.1 Aspectos bioquímicos do metabolismo de moluscos	23
2.2.1.1 Metabolismo energético	23
2.2.1.2 Metabolismo de proteínas e de produtos nitrogenados.....	25
2.2.1.3 Atividades das aminotransferases: Aspartato aminotransferase (AST) e Alanina aminotransferase (ALT).....	27
2.2.2 Biologia reprodutiva de <i>Pseudosuccinea columella</i>	28
2.2.3 Alterações histopatológicas de moluscos parasitados	29
2.2.4 Controle Moluscicida	31
2.3 Nematoides entomopatogênicos e o controle biológico de parasitos.....	32
2.3.1 <i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	35
2.3.2 Controle com nematoides entomopatogênicos	37
3. MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1 Obtenção de <i>Pseudosuccinea columella</i>	39
3.2 Obtenção do nematoide <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> HP88.	40
3.3 Exposição experimental aos nematoides, formação dos grupos experimentais e manutenção dos moluscos.....	40
3.4 Dissecção e coleta da hemolinfa e tecidos.....	42
3.5 Análises das alterações bioquímicas em <i>Pseudosuccinea columella</i> exposta ao nematoide <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> HP88.....	43
3.5.1 Metabolismo dos carboidratos.....	43
3.5.2 Determinação de proteínas totais (PTT).....	44

3.5.3 Determinação de ácido úrico e ureia.....	44
3.5.4 Determinação das atividades da aspartato aminotransferase (AST) e da alanina aminotransferases (ALT).....	44
3.6 Histologia de <i>Pseudosuccinea columella</i> expostas ao nematoide <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> HP88.	45
3.7 Análise da mortalidade e taxa ovipositória de <i>Pseudosuccinea columella</i> exposta ao nematoide <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> HP88.....	45
3.8 Análise dos dados	46
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1 Alterações bioquímicas em <i>Pseudosuccinea columella</i> expostas a <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> HP88	46
4.2 Avaliação da mortalidade e da biologia reprodutiva de <i>Pseudosuccinea columella</i> expostos a <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> HP88.....	55
4.3 Alterações histológicas de <i>Pseudosuccinea columella</i> expostos a <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> HP88	52
5. CONCLUSÃO	55
6. REFERÊNCIAS.....	56

1. INTRODUÇÃO

Os moluscos são seres invertebrados que ocupam um papel importante na medicina veterinária e humana, pois participam como hospedeiros intermediários (HI) de vários parasitos, principalmente de trematódeos. Dentre eles os moluscos gastrópodes, como exemplo *Pseudosuccinea columella* (*Syn. Lymnaea columella*) (Say, 1817), demonstram hábitos aquáticos e colonizam sobretudo águas estagnadas ou de cursos lentos presentes em regiões neotropicais (MAS-COMA; VALERO; BARGUES, 2009). Essa espécie participa obrigatoriamente no ciclo de vida, como HI, do trematoda *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758), agente causal da fasciolose, uma enfermidade distribuída mundialmente, que acomete principalmente o fígado e ductos biliares de ruminantes, equinos, suínos, animais selvagens (BENNEMA *et al.*, 2014).

Além dos impactos econômicos, principalmente na bovinocultura, causados pelos prejuízos diretos e indiretos da fasciolose, a enfermidade é considerada uma zoonose, da qual a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que pelo menos 2,4 milhões de pessoas estão infectadas em mais de 75 países em todo o mundo, além de outras milhares em risco de infecção. Além disso, a OMS também destaca que nenhum continente está livre da fasciolose, e é provável que, onde casos de animais sejam relatados, casos humanos também existam (WHO, 2020).

Há muitos anos, o controle desses moluscos tem sido realizado com a utilização de moluscidas químicos (SINGH *et al.*, 2010), entre eles sulfato de cobre, gramaxone, hidróxido de cálcio, n-tritilmorfolina e niclosamida (NEVES, 2016). No entanto, Cantanhede *et al.* (2010) descrevem que o uso de tais compostos, tem gerado preocupação em relação a toxicidade para espécies não-alvo, devido à sua baixa seletividade; contaminação do meio ambiente, por se acumularem, comprometendo assim a saúde única; pouca especificidade biocida e elevado custo de aplicação, o que os tornam limitantes como moluscidas oficiais em programas de controle.

Dessa forma, há a necessidade do desenvolvimento de medidas alternativas e estratégias de controle eficazes que minimizem a contaminação ambiental. Neste cenário, surge como opção ao controle químico, o controle biológico com a utilização de nematoides entomopatogênicos (NEPs), capazes de colonizar e matar a espécie parasitada. Para se alimentarem, esses NEPs utilizam os produtos resultantes da

ação de bactérias endossimbiontes, que degradam tecidos de seus hospedeiros (DOLINSKI, 2006b).

Dentre as características que os tornam favoráveis como agentes para o controle biológico, está a sua facilidade de cultivo *in vitro*, o que implica no baixo custo de produção; a elevada virulência; alta especificidade para artrópodes e a segurança em vertebrados, plantas e outros microrganismos não alvos (DOLINSKI, 2006b). Somada ao fato de que nematoides pertencentes ao gênero *Heterorhabditis* (Poinar, 1976) são naturalmente isolados dos solos (CICHE *et al.*, 2006) e que *P. columella*, são considerados moluscos “anfíbios”, pulmonados e podendo ser coletados inclusive em locais próximos à água, assim permite, em condições naturais, sua exposição a *Heterorhabditis*.

Pesquisas neste campo vêm sendo realizadas, como os de Schurkman e Dillman (2021), que avaliaram estudos que foram realizados em molusco gastrópodes, com NEPs, ressaltando que apesar de crescente no controle de diversas pragas, os trabalhos em moluscos gastrópodes ainda detêm poucos relatos em literatura. Das espécies de moluscos citadas encontra-se *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821), *Deroceras agreste* (Linnaeus, 1758), *Deroceras reticulatum* (Muller, 1774), *P. columella*, *Oncomenia hupensis* (Gredler, 1881) e *Parmacella ibera* (Eichwald, 1841) e tais estudos concentraram-se aos gêneros de nematoide *Heterorhabditis* e *Steinernema* (Travassos, 1927).

Tunholi *et al.* (2014), avaliaram a influência da infecção de *Heterorhabditis indica* LPP1 (Poinar; Kranukar; David, 1992) em *B. similaris*, molusco HI de *Eurytrema coelomaticum* (Giard; Billet, 1892). Segundo os autores, a infecção pelos NEPs 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.

Saeedizadeh e Niasti (2020), estudaram três diferente NEPs, *Steinernema feltiae* (Filipjev, 1934), *Steinernema carpocapsae* (Weiser, 1955) e *Heterorhabditis bacteriophora* (Poinar, 1976), para o potencial controle da lesma *P. ibera*, uma grande praga de cítricos no norte do Irã. Os resultados revelaram que a mortalidade da lesma é reforçada com a ampliação do tempo de exposição e aumento do número dos nematoides e todas as espécies estudadas foram capazes de controlar a população de *P. ibera*.

Além deste, em *P. columella*, o nematoide *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Phan; Subbotin; Nguyen; Moens, 2003) foi testado por Tunholi *et al.* (2017) e Vidal *et al.* (2021) e ambos observaram interferências ligadas a biologia reprodutiva e alterações fisiológicas no limineídeo em questão. Adicionalmente as alterações descritas, Tunholi *et al.* (2017) relataram taxa média de mortalidade de 66%. Embora seja conhecido que algumas espécies do gênero *Heterorhabditis*, como *H. indica*, *H. baujardi*, *Heterorhabditis heliothidisa* e *H. heliothidis* T327 (Khan, Brooks & Hirschmann, 1976), seja infectivo em moluscos gastrópodes, não foram encontrados relatos na literatura da espécie *H. bacteriophora* linhagem HP88 em *P. columella*, categorizando a proposta do presente trabalho inédita.

Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito moluscicida, *in vitro*, da infecção de *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 em *P. columella*, bem como caracterizar parâmetros fisiológicos, biológicos e reprodutivos desses limineídeos, sob condições laboratoriais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Fasciola hepatica* e o cenário da fasciolose no Brasil

A fasciolose é uma enfermidade causada por *F. hepatica* (Linnaeus, 1758), um helminto da classe Trematoda (ALEIXO *et al.*, 2015; MAZERI *et al.* 2016). Possui corpo achatado no sentido dorsoventral, de aparência foliácea e coloração pardocinzenta (TAYLOR; COOP; WALL, 2016).

Este helminto tem como hospedeiro definitivo (HD) diversos mamíferos e no Brasil apresenta altas taxas de morbidade entre os animais afetados. Além de sua importância econômica, existe a preocupação com a saúde pública visto que é uma metazoonose. Casos humanos são relatados em todos os continentes, e estima-se que existam cerca de 2,4 milhões de pessoas acometidas no mundo (WHO, 2020).

A patologia repercute em perdas econômicas significativas. Rebanhos com animais positivos, reduzem a produção de leite em cerca de 1,5 Kg de leite por vaca por dia em relação a rebanhos com ausência de animais positivos para a doença (MEZO *et al.*, 2011). Além da diminuição na produção do leite, a infecção poderá cursar com a redução no ganho de peso, e, por conseguinte, na produção de carne, condenações de fígados em abatedouros, queda nas taxas de fertilidade, descarte prematuro de animais e tratamento de animais doentes (SCHWEIZER *et al.*, 2005).

No Brasil, entre os estados que podem ser citados como de maior frequência para fasciolose, estão São Paulo, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Minas Gerais, Goiás e Paraná (OLIVEIRA; SPOSITO-FILHA, 2009). No Espírito Santo (ES), diversos autores têm comprovado a alta prevalência desta enfermidade enquadrando como área endêmica (BERNARDO *et al.*, 2011; MARTINS *et al.*, 2012; MARTINS *et al.*, 2014). De 23 municípios avaliados por Martins *et al.* (2014), em 18 deles a fasciolose em bovinos foi diagnosticada e Jerônimo Monteiro, município componente da região do Caparaó, destacou-se como o de maior prevalência, com índice de 66,7% positivos para a infecção.

Coletas realizadas por Vieira *et al.* (2011) revelaram que em um matadouro-frigorífico situado no estado do ES, durante os anos de 2008 a 2010, com Serviço de Inspeção Estadual (S.I.E), demonstrou que a fasciolose hepática foi a principal causa de condenação de fígados em bovinos, perfazendo um total de 62,15%. Já nos

períodos de 2014 a 2017, Thomaz *et al.* (2019) relataram 22,20% e Almeida *et al.* (2021) 5,36% de prevalência de descarte por fasciolose, ambos dados de levantamento de registros do S.I.E da mesma região, entre 2017 a 2019. Observa-se que houve uma queda da prevalência ao longo dos anos, fato este, que pode ser atribuído aos programas de controle implementados nessas localidades.

Na região da zona da mata mineira, Souza *et al.* (2017), avaliaram a prevalência das principais causas de condenação de fígado bovino em abatedouro frigorífico sob Serviço de Inspeção Federal (S.I.F), entre os anos 2007 e 2013, e a fasciolose representou 21,95% das condenações. A porcentagem de casos positivos detectados em abatedouros se equipara com dados descritos por Dutra *et al.* (2010) nos estados de Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, durante os anos de 2003 a 2008, de 29,51%, e Teixeira, Quevedo e Quevedo (2020) em Pelotas - Rio Grande do Sul, entre 2009 e 2014, relataram prevalência de 25,38%.

No Rio de Janeiro, no município de Campos dos Goytacazes, Gomes *et al.*, (2002), identificaram 15,38% de animais infectados por fasciolose, por meio de relatórios emitidos, por dois matadouros do município, à Secretaria Estadual de Agricultura.

As perdas decorrentes desta alta prevalência foram levantadas por Bernardo *et al.* (2011), entre anos de 2006 e 2009, e o prejuízo econômico causado pela condenação de fígados parasitados por *F. hepatica* encontrados no sul do ES foi de R\$ 649.187,50, o que corresponde a 381.875 dólares americanos. Só no ano de 2009, as perdas foram da ordem de 132.000 dólares. Echevarria (1995) constatou que a perda anual por fígados condenados no Rio Grande do Sul chega a 140.000 dólares, um estado com um rebanho bovino muito maior que o do Espírito Santo.

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

As condições edafoclimáticas são os fatores que mais favorecem a prevalência da fasciolose no Brasil, sendo o clima e a formação de áreas alagadas permanentes ou periódicas os principais exemplos (ALEIXO *et al.*, 2015; MOLENTO *et al.*, 2018). Neste sentido, Martins *et al.* (2012) enfatizam que as condições ambientais do estado

do ES o tornam uma potencial região de reprodução dos moluscos HI, por possuir clima úmido e quente e a topografia local ideal.

A distribuição de *F. hepatica* depende da presença de limneídeos que se mostram susceptíveis e permissivos a infecção. No Brasil, as espécies que se mostraram suscetíveis a infecção por *F. hepatica* são *Lymnaea truncatula* (Müller, 1774), *Lymnaea viatrix* (Orbigny, 1835) e *Lymnaea cubensis* (Pfeiffer, 1839). Porém, *L. columella*, atualmente renomeado para *P. columella*, apresenta maior distribuição geográfica no país (MEDEIROS *et al.*, 2014).

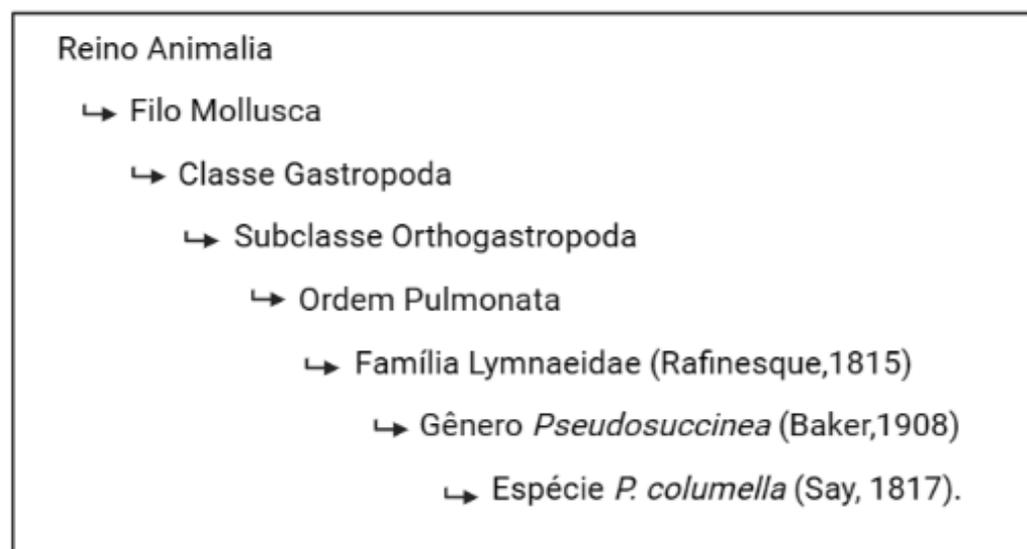
A interação parasito-hospedeiro está relacionada com a susceptibilidade do hospedeiro e com a capacidade do parasito em reconhecer e evadir o sistema interno de defesa do molusco (LOCKYER *et al.*, 2004). Quanto ao trematoda *F. hepatica* é dito por alguns autores que existe uma atração miracidiana em relação aos moluscos. Esta atração seria decorrente da detecção de substâncias como glicoconjugados, pelo miracídio, que seriam secretados/excretados pelos moluscos e que se difundiriam pelo meio aquático, sendo detectados pelos estágios miracidiais através das terminações sensoriais da papila apical, ou terebratorium (BARBOSA, 1995).

Com o ciclo biológico heteroxênico, suas fases compreendem na eliminação dos ovos nas fezes do HD, e estas entram em contato com regiões alagadas. Após 14 dias, em média, ocorre o desenvolvimento dos miracídios e estes eclodem dos ovos e migram ativamente a procura do HI, penetrando-o em suas partes moles. Agora no interior do molusco infectado, os miracídios tornam-se esporocistos e neste há o desenvolvimento das rédeas e depois em cercárias. As cercárias voltam para o ambiente externo, água, e fixam-se nas vegetações aquáticas, encistando como metacercárias, que são a forma infectante para o HD. O período após a penetração do miracídio até a formação de metacercárias varia entre 45 a 60 dias. As metacercárias se desencistam no intestino delgado, migram e penetram na cápsula hepática, e migração pelo parênquima hepático até se alojarem nos ductos biliares, aonde vão se instalar e amadurecer, liberando ovos nas fezes (SILVA *et al.*, 1980, BOWMAN, 2014).

2.2 Hospedeiro intermediário de *Fasciola hepatica*

Os moluscos gastrópodes da família Lymnaeidae atuam como hospedeiros intermediários do trematódeo *F. hepatica*, sendo *Lymnaea columella* renomeada recentemente para *P. columella* (MEDEIROS *et al.*, 2014) a principal espécie encontrada no Brasil. Sua classificação taxonômica foi desenvolvida conforme mostra a figura 1.

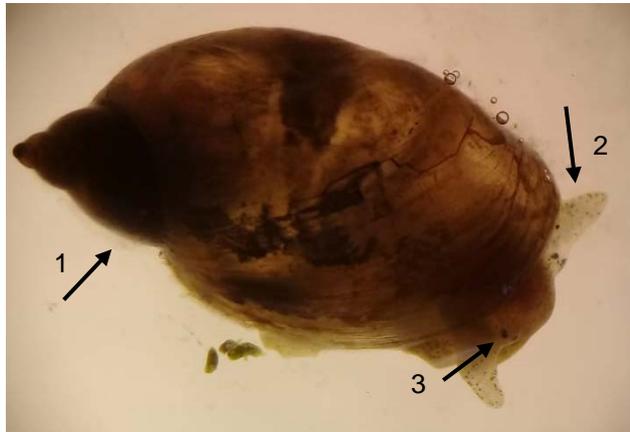
Figura 1 - Classificação de *Pseudosuccinea columella*.



Fonte: O autor

Morfologicamente, os limineídeos caracterizam por apresentar concha cônica alongada, apresentando voltas convexas, com suturas rasas ou profundas, giros para a direita (dextrogira) e com abertura tendendo à oval-alongada ou arredondada-ovóide que pode ocupar a metade ou até $\frac{3}{4}$ do comprimento total da concha (CARVALHO, 2014) (Figura 2).

Figura 2 - Exemplar de *Pseudosuccinea columella*, evidenciando os aspectos conquiliológicos, seus tentáculos em formato triangular com achatamento e seus olhos compondo o centro da base dos tentáculos.

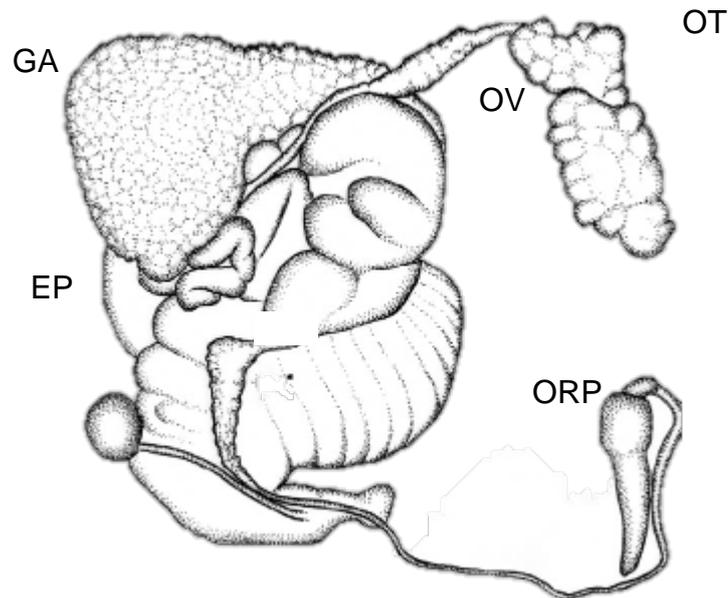


Fonte: Laboratório de Parasitologia - UFES.

Seta 1: aspectos conquiliológicos; seta 2: tentáculos; seta 3: olhos

Além da análise morfológica externa, há a caracterização anatômica dos órgãos internos desses gastrópodes, em especial: a massa cefalopediosa, estrutura muscular externa à cocha, com coloração cinza difusamente pálida com pontos brancos, sendo considerada a estrutura principal da região cefálica, demonstrando importante função sensorial e motora; o manto, estrutura interna a concha, que recobre a cavidade pulmonar e pericárdica, de coloração acinzentada; a glândula de albúmen (Figura 3), apresentando como um órgão volumoso, parenquimatoso, que se encontra em íntimo contato com o oviduto e a glândula nidamental (PARAENSE, 1982), sendo esta, encontrada no interior da concha, dorso caudal a glândula digestiva (GOMES, 1985; DIAS, 2013; CARVALHO, 2014).

Figura 3 - Anatomia reprodutiva de *Pseudosuccinea columella*.



Fonte: Adaptado de Pointier *et al.*, 2009.

GA: glândula de albúmen; OT: ovotestes; OV: oviduto; ORP: órgão reprodutor masculino; EP: espermateca.

São animais hermafroditas, possuindo também a capacidade de se autofecundar; em muitos ambientes, esta é a principal forma de reprodução, devido a presença da glândula denominada ovotestes, onde estão localizadas as células germinativas femininas e masculinas, sendo recoberta pela glândula albuminosa (KANAPALA; ARASADA, 2013).

Interligados por um lóbulo acessório, a glândula digestiva, é composta por ácinos 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 além de uma lâmina própria constituída por tecido conjuntivo fibroso. Como principal função destaca a manutenção do metabolismo energético do hospedeiro, sendo por isso considerado o principal sítio de desenvolvimento de estágios larvais de trematódeos e nematóides (KANAPALA; ARASADA, 2013).

Semelhante a outros caramujos, depositam ovos translúcidos em meio a uma massa gelatinosa, enfileirados, uma média de 30 ovos. 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 nidação, onde a fertilização ocorre. Posteriormente,

verifica a síntese de massas ovíferas, 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 se faz no ambiente e a liberação dos caramujos das massas ovíferas ocorrerá entre 14 e 15 dias, dependendo do favorecimento das condições ambientais (TAIR-ABBACI *et al.*, 2017).

Esses limneídeos alimentam-se de algas e vegetais em decomposição. Sua longevidade é estimada em cerca de 180 dias, colonizando os mais variados tipos de corpos d'água (rios, lagos, lagoas), muitas vezes em condições de baixa oxigenação, podendo ser encontrados em bebedouros (Figura 4). Isto porque são animais anfíbios, pulmonados, podendo ser coletados inclusive em locais imersos próximos à água (MEDEIROS *et al.*, 2014). Os fatores ideais para ocorrência do hospedeiro intermediário envolvem umidade adequada e temperatura acima de 15-25°C (FREITAS *et al.*, 2014; TAYLOR; COOP; WALL, 2016).

Figura 4 - (A) Bebedouro do setor de bovinocultura do Instituto Federal do Espírito Santo – Campus Alegre, com exemplares de *Pseudosuccinea columella*. (B) *P. columella* em aquário da colônia do Laboratório de Parasitologia do Hospital Veterinário da Universidade



Fonte: O autor

2.2.1 Aspectos bioquímicos do metabolismo de moluscos

2.2.1.1 Metabolismo energético

Nos gastrópodes pulmonados, o metabolismo energético é baseado principalmente a partir da degradação de carboidratos, os quais são armazenados na forma de polissacarídeos, sendo o glicogênio e o galactogênio, os de maior importância para o metabolismo energético e à reprodução, respectivamente, e mais abundantemente encontrados nesses hospedeiros (GERAERTS, 1992). Somado a isso, já é sabido que moluscos gastrópodes possuem a capacidade utilizarem outras fontes carbonadas, como lipídeos e proteínas. Estes moluscos, em situações de estresse fisiológico, tais como, jejum e parasitismo, após o consumo das reservas de carboidratos, os lipídeos são mobilizados para o uso como substrato alternativo na produção de energia (STOREY, 2002; GIOKAS; PAFILIS; VALAKOS, 2005).

O glicogênio é um polímero de D-glicose de cadeias lineares. Esta macromolécula pode ser composta apenas por resíduos de glicose ou apresentar outros componentes, notadamente, açúcares derivados, como os amino açúcares, sendo, então, denominados homopolímeros ou heteropolímeros, respectivamente. Em condições fisiológicas, o metabolismo energético de gastrópodes é dependente de vias aeróbias, porém quando submetidos a condições de estresse, como o parasitismo, esses organismos podem redirecionar seu fluxo metabólico, resultando na ativação de outras vias bioquímicas, inclusive, vias fermentativas (TUNHOLI *et al.*, 2011; AMARAL, *et al.* 2021). Dados obtidos por Tunholi *et al.* (2014) ao estudarem as alterações fisiológicas de *B. similis* induzidas pelo nematoide entomopatogênico *H. indica* LPP1, reforçam esta afirmação.

O glicogênio nos moluscos gastrópodes é encontrado nas células da glândula digestiva, responsável por normalizar os níveis de glicose na hemolinfa atuando diretamente na manutenção da homeostase glicêmica; e na massa cefalopédica, tecido muscular, responsável por fornecer energia durante a realização de atividade, como a locomoção ou em situações de estresse (PINHEIRO; AMATO, 1994).

O galactogênio, no entanto, é encontrado exclusivamente na glândula de albúmen e em posturas recentes. A glândula de albúmen é um tecido exócrino constituído por tipos de células secretoras, as quais sintetizam o polissacarídeo em questão, que posteriormente é armazenado em vesículas membranosas destinadas

ao complexo golgiense e células ciliadas. Assim, lipídios e glicogênio são formados a partir do galactogênio (BECKER, 1980).

Os ovos dos gastrópodes pulmonados são ricos em galactogênio e proteína, moléculas energéticas que compõem as massas ovíferas destes organismos. A glândula de albúmen é ainda responsável pela secreção do fluido peri-vitelínico, no qual mostra-se constituído por proteínas e galactogênio e preenche as bolsas que circundam os embriões, sendo responsável pela nutrição destes (GOUDSMIT, 1972). Assim, em consequência do esgotamento das reservas desse polissacarídeo, espera-se comprometimento na performance reprodutiva dos moluscos, tanto na redução do número total de ovos, como na eclodibilidade embrionária destes. Tal condição foi descrita por Tunholi *et al.* (2017) estudando a interface *P. columella*/*H. baujardi* LPP7 e Amaral *et al.* (2021), com *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818)/*H. bacteriophora*.

Bayomy; Elk; Joosse (1987) observaram que em condições de jejum severo, *Bulinus truncatus* (Audouin, 1872) demonstrou uma diminuição significativa na postura de ovos, entretanto, 24h após o restabelecimento da alimentação a oviposição retornou ao patamar de normalidade. Tais resultados indicam que em condições de estresse energético, uma das primeiras atividades biológicas a serem cessadas ou reduzidas em gastrópodes é a performance reprodutiva.

Estudos demonstraram que o principal substrato energético utilizado por trematódeos para o desenvolvimento de esporocistos e, conseqüentemente, das cercárias é representado por monômeros de glicose. Assim, espera-se que haja redução na concentração desse monossacarídeo na hemolinfa de moluscos infectados. O desequilíbrio causado na composição glicídica da hemolinfa, leva o molusco a dispor de suas reservas de carboidratos, o que causa a depleção dos estoques de glicogênio, caracterizando um quadro de balanço energético negativo (BECKER, 1980).

Condição similar foi verificada Amaral *et al.* (2021) ao observarem redução significativa nos conteúdos de glicose após infecção por *H. bacteriophora* em *B. glabrata*. Estes autores reforçam que tais achados resultam da competição direta por nutrientes entre o molusco hospedeiro e o complexo nematoide/bactéria, uma vez que estudos *in vitro* têm confirmado a habilidade da bactéria endossimbiótica, *Photorhabdus luminescens* (Thomas; Poinar, 1979), em usar glicose como substrato energético, favorecendo o estado de hipoglicemia (GIL; CHOO; GAUGLER, 2002).

A concentração de glicose na hemolinfa diminuiu significativamente nos grupos compostos por caracóis (*B. glabrata*) infectados com *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) e *Echinostoma paraensei* (Lie; Basch, 1967) em comparação ao controle, assim como o teor de glicogênio na massa cefalopédica, no estudo de Bonfim *et al.* (2020).

2.2.1.2 Metabolismo de proteínas e de produtos nitrogenados

Tanto para vertebrados quanto para invertebrados, o carboidrato é a principal fonte imediata de energia, enquanto que a proteína é considerada uma fonte secundária, sendo suas reservas mobilizadas em situações de estresse fisiológico. Somado a isso, as proteínas também são encontradas na constituição de unidade celular; das enzimas essenciais ao metabolismo; transporte de substâncias e na composição de hormônios (proteicos) responsáveis pela regulação do metabolismo. Estruturalmente, as proteínas são polímeros de aminoácidos unidos por ligações peptídicas e sua concentração plasmática em vertebrados é representada pelas frações de albumina e globulinas (CHRISTENSON; FINLEY; SILVERMAN, 1989).

Moluscos quando infectados por estágios larvais de trematódeos e nematóides, apresentam severas alterações fisiológicas, principalmente em decorrência da competição por nutrientes entre o parasito e o hospedeiro. Gress e Cheng (1973) observaram na hemolinfa de *B. glabrata* infectadas por *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907) redução significativa na concentração de proteínas totais, alcançando um terço do valor constatado para os animais não infectados. Neste estudo, os autores consideraram a possibilidade dos estágios larvais do parasito em absorverem diretamente aminoácidos da glândula digestiva do hospedeiro.

A infecção por larvas de trematódeos é descrita como uma condição fisiológica similar ao jejum, uma vez que ambas as situações induzem alterações quantitativas e qualitativas nos níveis de carboidratos e proteínas em moluscos (BECKER; SCHMALE, 1975; PINHEIRO, 1996). A ativação do catabolismo proteico é observada, repercutindo em um significativo decréscimo deste substrato na glândula digestiva e hemolinfa dos organismos infectados (PINHEIRO; MALDONADO; LANFREDI, 2009).

Backry (2009) observou significativo declínio nos níveis hemolinfáticos de albumina em *Biomphalaria alexandrina* (Ehrenberg, 1831) infectadas por *S. mansoni* e atribuiu este fato ao prejuízo histológico observado na glândula digestiva destes hospedeiros, uma vez que, representa o principal sítio de síntese deste substrato.

Quando os moluscos passam a utilizar outros substratos, como por exemplo as proteínas, para a obtenção de energia afim de reverter o balanço energético negativo, instaurasse juntos os produtos nitrogenados de excreção, ácido úrico e ureia, decorrente da transaminação de aminoácidos (PINHEIRO, 1996; BONFIM *et al.*, 2014; AMARAL *et al.*, 2021).

Os gastrópodes fazem excreção sob condições normais, de íons de amônio e sob estresse fisiológico liberam formas alternativas a partir de um padrão ureotélico (ureia) ou uricotélico (ácido úrico) (MELLO-SILVA *et al.*, 2010).

Em vertebrados, a ureia é um subproduto nitrogenado obtido mediante degradação de proteínas. Sua síntese depende tanto da função hepática quanto do equilíbrio proteico (produção de amônia). É o principal produto final do metabolismo de proteínas quando a amônia, liberada durante a desaminação de aminoácidos, é transformada em ureia no fígado. Uma vez formada, a ureia é transportada do fígado pelo sistema vascular e se difunde de forma passiva por toda a água corporal (THRALL *et al.*, 2015).

Thompson, Mejia-Scales e Borchardt (1991), estudando a relação entre *B. glabrata* e *S. mansoni*, verificaram que a infecção induziu intensa proteólise no molusco hospedeiro, culminando com a produção de amônia que necessita ser detoxificada via purinas, como ácido úrico, levando o caramujo demandar de uma maior quantidade de energia.

Moluscos aquáticos apresentam um padrão uricotélico de excreção. Para alguns autores, o ácido úrico tem a vantagem de poder ser excretado com pequena perda de água, porém a ureia é menos tóxica ao molusco, embora sua excreção represente mais perda de água. Então, Pinheiro, Maldonado e Lanfredi (2009) relataram que quando se verifica a inversão do padrão uricotélico para ureotélico em moluscos infectados sugere-se uma capacidade adaptativa do hospedeiro.

2.2.1.3 Atividades das aminotransferases: Aspartato aminotransferase (AST) e Alanina aminotransferase (ALT)

As aminotransferases, são enzimas responsáveis pela conversão de grupamentos amino de um aminoácido em um α -cetoácido (MOSS; HENDERSON, 1998), desempenhando assim, um papel importante no metabolismo energético. Além disso, a transaminação de aminoácidos resulta na formação de subprodutos essenciais para o desenvolvimento dos parasitas, como a arginina. Essas alterações podem alterar as taxas de glicogênese, gliconeogênese e glicólise no caracol (MELLO-SILVA *et al.*, 2010; BONFIM *et al.* 2020). Ademais, as transaminases têm sido frequentemente utilizadas como excelentes biomarcadoras de lesão celular (TUNHOLI *et al.*, 2011, TUNHOLI-ALVES *et al.*, 2012).

Então, as aminotransferases constituem um grupo de enzimas que catalisa a interconversão de aminoácidos a 2-oxo-ácidos pela transferência de grupos amino. A aspartato aminotransferase (AST) (EC 2.6.1.1; 1-aspartato:2-oxoglutarato aminotransferase) e a alanina aminotransferase (ALT) (EC 2.6.1.2; l-alanina:2-oxoglutarato aminotransferase) são exemplos de aminotransferases de interesse clínico. A dupla 2-oxoglutarato/l-glutamato serve como um par doador em todas as reações de transferência de grupo amino. A especificidade de cada enzima advém do aminoácido específico que serve como o outro doador de um grupo amino (TIETZ, 2016).

Dentre as aminotransferases, a ALT se destaca, por se trata de uma enzima presente no citosol de vários tipos de células, considerada uma enzima de extravasamento celular. Em vertebrados é verificada em hepatócitos (especialmente naqueles da região periportal) e em menor quantidade nos rins, músculos cardíaco e esquelético e hemácias. Em moluscos, autores relatam o aumento de sua atividade tanto na hemolinfa quanto nos tecidos de organismos infectados por larvas de trematódeos e nematóides (MANOHAR; RAO; SWAMI, 1972; CHRISTIE; MICHELSON, 1975). Tal alteração, decorre em parte de lesões celulares impostas pelos estágios larvais do parasito em desenvolvimento em tecidos do hospedeiro associadas com a necessidade deste em restabelecer sua glicemia.

A ALT pode ser liberada quando há lesão celular (extravasamento) e necrose, bem como no caso de indução enzimática (aumento da síntese). Em quadros de colestase e obstrução do trato biliar, autores tem verificado em vertebrados aumento

da atividade plasmática da ALT, como resultado dos efeitos tóxicos dos sais biliares nos hepatócitos (THRALL *et al.*, 2015).

Por sua vez, a aspartato aminotransferase (AST) é encontrada em maior concentração nos músculos esqueléticos, fígado e músculo cardíaco, portanto, seu aumento indica a ocorrência de lesão hepatocelular ou muscular sendo liberada em processos de lesão celular subletal (extravasamento) ou necrose. Nas lesões leves, apenas a AST citoplasmática é liberada, enquanto que em lesões graves verifica também o extravasamento da enzima mitocondrial (THRALL *et al.*, 2015).

2.2.2 Biologia reprodutiva de *Pseudosuccinea columella*

A relação parasito-hospedeiro pode ser complexa, não se limitando apenas ao hospedeiro ser resistente ou susceptível ao parasito. Segundo Wakelin (1978), a infecção e o sucesso reprodutivo passam pela variação genética intraespecífica, na qual é constante a busca pela caracterização do comportamento de um parasito dentro de um hospedeiro, assim como o sucesso ou os efeitos negativos associados (MINCHELLA, 1985).

Neste contexto, Minchella (1985) postulou o fenômeno “compensação de fecundidade” que se caracteriza como uma explosão de postura de ovos imediatamente após a exposição ao parasito, em resposta a uma adaptação do molusco frente ao parasitismo de trematódeos. A autora explica que o aumento da atividade reprodutiva visa compensar a perda futura, constatada no momento da infecção, até a efetiva interferência pelo desenvolvimento do parasito. Tal fenômeno foi observado em *B. glabrata* e *B. alexandrina* expostos a *S. mansoni*, denotando aumento significativo na postura de ovos pelos moluscos durante o período pré-patente de desenvolvimento parasitário.

Pan (1965) relatou que a exposição de caracóis, sexualmente maduros, após três semanas a exposição ao parasito, favoreceu o aumento na postura de ovos em relação ao controle. Esta resposta é consistente com a fecundidade estratégia de compensação que favorece genótipos com maturação sexual precoce em resposta a infecção por trematódeos. Caracóis com este genótipo se reproduzirão antes do parasito esgotar suas reservas energéticas ou lesionar os sítios reprodutivos.

Lima *et al.* (2017) ao avaliarem os efeitos da infecção experimental de *A. cantonensis* quanto a biologia reprodutiva de *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) e *Biomphalaria tenagophila* (d'Orbigny, 1835), relataram a ocorrência da compensação reprodutiva em ambas as espécies.

Outro fenômeno observado é o da castração parasitária que, na relação molusco vs trematoda, pode ser entendida como qualquer mudança na função reprodutiva, destruição ou alteração do tecido gonadal do hospedeiro, que leve à redução ou completa interrupção da atividade de colocação de ovos (FARO *et al.*, 2013). Tal fenômeno foi visto por esses últimos autores e por Cooper *et al.* (1994) durante a interface *B. glabrata/S. mansoni*.

Baudoin (1975) ainda ressalta que a castração pode ser caracterizada por uma causa imediata, através da interferência mecânica com as gônadas, seja em função de uma atrofia tecidual, explicada por um desvio de nutrientes que seriam utilizados para o desenvolvimento e manutenção das gônadas, ou em decorrência de um processo degenerativo tecidual induzido pela presença física do parasito nas gônadas. Pinheiro, Maldonado e Lanfredi (2009) consideram que a castração parasitária é uma resposta adaptativa do hospedeiro frente à infecção. Quando infectados, moluscos apresentam um balanço energético negativo mobilizando suas reservas polissacarídicas principalmente da glândula digestiva e massa cefalopediosa para a sua sobrevivência.

Este fenômeno foi observado em uma ampla variedade de interações parasito-hospedeiro. Paschoal e Amato (1996) avaliaram as alterações no perfil reprodutivo de *B. similis* infectadas por *E. coelomaticum* onde após estudo histológico observou um estado degenerativo no ovotestis, redução da espermatogênese, bem como nas posturas de ovos nos organismos infectados, ratificando a hipótese sugerida por Baudoin (1975).

2.2.3 Alterações histopatológicas de moluscos parasitados

A histopatologia tem se mostrado uma ferramenta acessível, eficaz e usualmente aplicada em estudos relacionados a susceptibilidade de moluscos a diferentes espécies de helmintos (TUNHOLI-ALVES *et al.*, 2014, 2015; VIDAL *et al.* 2019). De acordo com estes autores, a infecção induz intensa desorganização celular

caracterizada pela proliferação de amebócitos e expansão de matriz extracelular, favorecendo o processo de fibrosamento e de calcificação metastática no tecido afetado.

Tunholi *et al.* (2017) demonstraram, sob condições experimentais, que a infecção por *H. baujardi* LPP7 induziu severas alterações histopatológicas em *P. columella*, sendo está caracterizada pela produção de um infiltrado hemocitário seguido pela formação de nódulos fibrosos. Para tais autores, estas reações comprometem a função do órgão afetado (complexo gônada-glândula digestiva), contribuindo para a perda da homeostase e morte dos moluscos em questão.

Faro *et al.* (2013) descreveram que *B. glabrata* infectada por *S. mansoni* apresentou no exame histopatológico: atrofia de ovotestes e desaparecimento de células germinativas, diminuição da densidade celular na glândula albuminosa, glândula digestiva com citoplasma pouco preservado. E reitera que esses achados sugerem uma redução dos recursos envolvidos na reprodução, levando à interrupção da oviposição durante o período patente da infecção.

Ainda em *B. glabrata*, agora infectado por *E. paraensei*, Tunholi *et al.* (2013) relataram lesão e desorganização celular do complexo gônada-glândula digestiva e relacionaram os achados a perda de funções fisiológicas normais destas glândulas, caracterizado pela incapacidade de armazenar glicose na forma de glicogênio, explicando assim as alterações glicêmicas observadas.

Martins (2018), ao estudar o gastrópode terrestre *Bulimulus tenuissimus* como potencial hospedeiro de *A. cantonensis*, observou, histologicamente, infiltrado hemocitário na massa cefalopediosa, local de preferência para o desenvolvimento das larvas, perda de organização dos ácinos da glândula digestiva, células epiteliais com uma clara vacuolização no citoplasma e material amorfo no lúmen acinar, sugestivo de picnose e cariorexia indicando processo de apoptose, e na reação de PAS mostrou uma pequena quantidade de glicogênio nessas células.

Vidal *et al.* (2021) indicaram que a exposição ao *H. baujardi* LPP7 culminou em desarranjos celulares importantes em *P. columella*, sendo as alterações descritas o infiltrado hemocitário na glândula digestiva, diminuição das células femininas e masculinas na glândula reprodutiva, culminando em um déficit na produção, degeneração no manto.

2.2.4 Controle Moluscicida

Com um ciclo biológico indireto, *F. hepatica* necessita obrigatoriamente de um hospedeiro intermediário molusco. Sendo assim, uma alternativa para o controle da fasciolose, especialmente para regiões consideradas endêmicas, é eliminação populacional desse molusco (MOTA; CAMPOS; ARAÚJO, 2003), sendo esta alternativa uma indicação da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2020).

Os métodos de controle de moluscos podem ser classificados em: físico, químico e biológico. O controle físico envolve a alteração no desenvolvimento dos moluscos, entre eles destaca-se o aterramento de corpos hídricos, drenagem e retificação de leitos, bem como limpeza e retirada da vegetação aquática (OLIVEIRA; SPOSITO-FILHA, 2009).

O método mais conhecido e empregado nos últimos anos tem sido o controle químico, com utilização de substâncias genericamente denominada moluscicidas. No entanto, o uso de moluscicida sintético tem gerado preocupação em relação a fatores como: toxicidade para outras espécies, devido à sua baixa seletividade; contaminação do meio ambiente, por se acumularem, comprometendo assim a saúde humana e animal (BRASIL, 2008).

Estima-se que mais de 7.000 produtos químicos sintéticos já foram testados com a finalidade moluscicida, mas poucos merecem destaque. Dentre eles, podem ser citados: sulfato de cobre, gramaxone, hidróxido de cálcio, n-tritilmorfolina, niclosamida, carbamato, metaldeído e organofosfato (CANTANHEDE *et al.*, 2010; SINGH *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2015).

No entanto, apenas um produto permanece disponível comercialmente e é aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) (CAS n.º 50-65-7) para uso em programas de controle: a niclosamida (N-(2'-cloro-4'-nitrofenil)-5-clorosalicilanilida), sobretudo em áreas endêmicas, de acordo com a Organização das Nações Unidas (ONU) (PINHEIRO *et al.*, 2003). O baixo número de registros de produtos moluscicidas pode estar relacionado ao não atendimento dos critérios estabelecidos pela Anvisa, dos quais são considerados: toxicidade e concentração da substância ativa; finalidade; condições de uso; relato de problemas já ocorridos; exposição do produto à população, bem como frequência e duração (VIDAL *et al.*, 2018).

Nesse contexto, existe a necessidade do desenvolvimento de novas alternativas de controle para tais organismos. Dentre estas, a utilização de metabólitos obtidos de algumas espécies de vegetais vem se mostrando viável como método alternativo de controle. Alvarez-Mercado *et al.*, (2015) citam alguns métodos com potencial moluscicida, que consistem no uso de fitoterápicos: extratos, óleos de plantas com compostos medicinais; além do controle biológico: mediante o emprego de espécies de fungos e de NEPs.

Os fungos e NEPs são agentes parasitários facultativos encontrados naturalmente em solos. Avaliando o potencial ovicida de fungos, Duarte *et al.* (2015) estudaram a vulnerabilidade de massas ovígeras de *B. glabrata* submetidas a infecção por *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) 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 deste planorbídeo. Já, Castro *et al.* (2019) avaliaram a utilização de *Pochonia chlamydosporia* (Goddard, 1913) linhagem Pc-10 em massas ovígeras de *P. columella*, *in vitro*. Segundo tais autores, o fungo em questão comprometeu o processo de embriogênese dos limineídeos, reduzindo a viabilidade dos ovos dentro das massas ovígeras.

Por sua vez, a utilização de NEPs se configura como uma alternativa eficaz e promissora para o controle de invertebrados. Tais nematoides atuam como veículos para bactérias simbiotes, que são patogênicas, que quando introduzidas no corpo dos invertebrados hospedeiros, provocam rápida septicemia, levando-o a morte (DOLINSKI, 2006b; TUNHOLI *et al.*, 2017), ou consideráveis desordens ligadas a biologia reprodutiva e fisiológica como observado por Vidal *et al.* (2021).

2.3 Nematoides entomopatogênicos e o controle biológico de parasitos

Taxonomicamente, Rhabditida é a ordem que abrange os NEPs. Inseridas nesta ordem, quatro famílias demonstram maior importância: Sphaerulariidae, Mermithidae, Heterorhabditidae e Steinernematidae, sendo os dois primeiros entomofílicos e os outros entomopatogênicos. Das famílias entomopatogênicas, os nematoides apresentam a capacidade de infectar, desenvolver e matar populações

de artrópodes alvos considerados como pragas agrícolas e de relevância médica veterinária, sendo por isso extensivamente utilizados no controle biológico destes organismos (DOLINSKI, 2006b, ALMENARA *et al.*, 2010).

Relatos na literatura demonstram o potencial de nematoides entomopatogênicos para o controle de diferentes pragas, inclusive já existe produção de nematoides em escala industrial no EUA, Canadá, Austrália, Suíça, República Tcheca, Itália, Reino Unido, Suécia, Alemanha, Holanda, Cuba, Japão e Israel. Recentemente no Brasil, a empresa Biocontrole começou a produzir e comercializar um produto a base de NEPs formulados em esponjas de poliuretano para o controle do bicudo da cana-de-açúcar, *Sphenophorus levis* (Laurie; 1978) (MONTEIRO; PRATA, 2013).

Dentre estas mais atenção tem sido dada a duas famílias: Steinernematidae, que compreende os gêneros *Neosteinerinema* (Nguyen; Smart, 1994) e *Steinerinema*; e Heterorhabditidae, com apenas o gênero *Heterorhabditis* (ADAMS *et al.*, 2006), que são considerados cosmopolitas, podendo ser encontrados em solos de diversos locais no mundo (LAWRENCE; HOY; GREWAL, 2006).

A forma infectante dos NEPs são os Juvenis infectantes (JIs), que infectam um inseto adulto ou larva ativamente, penetrando através de orifícios naturais como boca, ânus ou espiráculos respiratórios. Os JIs apresentam em seu tubo digestivo uma monocultura de bactérias endosimbiontes que permanecem com crescimento e metabolismo controlados dentro do intestino dos JIs, até que este encontre um inseto para infectar (ALMENARA *et al.*, 2012).

As bactérias entomopatogênicas são particulares de acordo com o gênero do NEP. As espécies do gênero *Heterorhabditis* têm associação com bactérias do gênero *Photorhabdus*, carregando-as na região anterior do intestino (BIRD; AKHURST, 1983; LEWIS *et al.*, 2006). Apesar da maioria dos estudos se concentrarem nos agentes primários, alguns estudos sugerem que os NEPs também carregam outras cepas bacterianas secundárias, mas a natureza ou potencial mutualista destes ainda não seja bem compreendido (BABIC *et al.*, 2000; OGIER *et al.*, 2020).

A simbiose entre o nematoide e as bactérias existe pelo fato de que estas exercem a função de levar a morte do hospedeiro, transformar seus tecidos em fonte de alimento, disponibilizá-lo como recurso alimentar e propiciar um ambiente adequado para reprodução dos nematoides. Em adição, tais endosimbiontes produzem antibióticos e outros metabólitos secundários que protegem o cadáver do

hospedeiro contra o desenvolvimento de microrganismos oportunistas e competidores. Por outro lado, os nematoides oferecem às bactérias proteção, tanto do ambiente externo quanto do sistema imunológico do hospedeiro (STOK; CAMPBELL; NADLER, 2001).

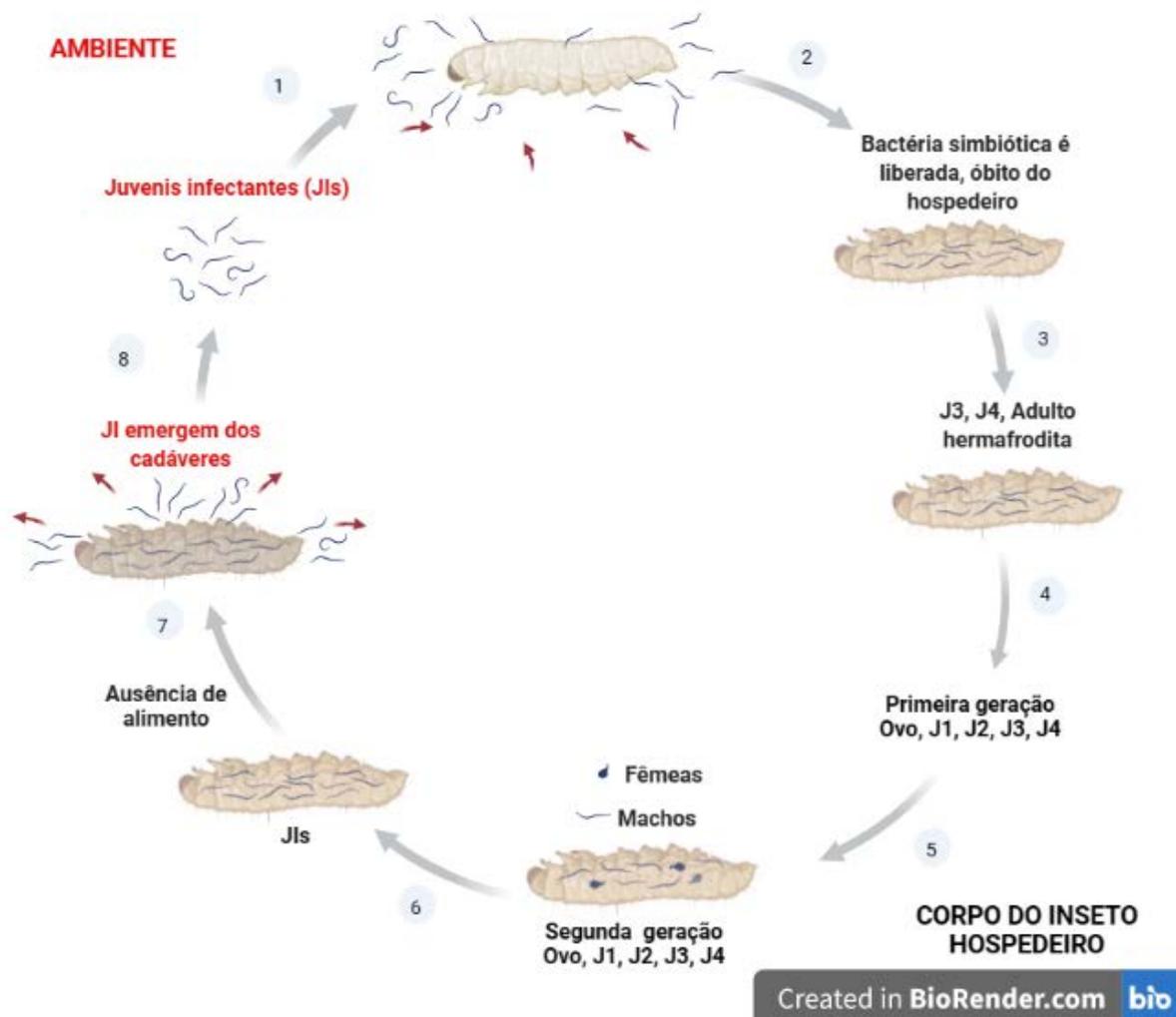
Assim que o NEP penetra em seu hospedeiro, liberam as bactérias endossimbiontes na cavidade corporal deste. Tais bactérias liberam uma série de toxinas e metabólitos secundários que impedem a resposta imune do hospedeiro, levando à uma septicemia e morte (WATERFIELD *et al.*, 2005). Essas bactérias atuam também na bioconversão do cadáver, que é realizada por enzimas hidrolíticas que convertem os tecidos do hospedeiro em biomassa bacteriana (ELEFThERIANOS *et al.*, 2010).

Os JIs, ao se alimentarem da biomassa convertida pelas bactérias, passam para os estádios J₃, J₄ e então se desenvolvem em adultos hermafroditas de primeira geração. Estes hermafroditas liberam ovos, dos quais eclodem larvas que passam pelos quatro estádios larvais (J₁, J₂, J₃ e J₄) e se desenvolvem na segunda geração de adultos, considerada dioica, com presença de machos e fêmeas. Esse ciclo com adultos machos e fêmeas se repete até que a fonte de alimento do cadáver do hospedeiro se esgote, ou a densidade populacional do nematoide seja muito alta (DOLINSKI, 2006a, NOGUEZ *et al.* 2012).

Nestas condições, os nematoides que deveriam se desenvolver em J₃ passam a JIs, processo estimulado e controlado por feromônios denominados ascarosídeos, dos quais saem do cadáver do hospedeiro, indo para o meio externo, reiniciando um novo ciclo quando um novo hospedeiro é infectado (Figura 5) (NOGUEZ *et al.*, 2012).

Em laboratório, o ciclo de vida descrito dura aproximadamente 15 dias quando mantido em larvas do lepidóptero *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758), e a morte do inseto acontece em aproximadamente 24h. Além disso, em laboratório, os JIs podem sobreviver e continuar infectantes por mais de um ano (ROSSI, 2014).

Figura 5 - Esquema do ciclo de vida dos nematoides entomopatogênicos do gênero *Heterorhabditis* dentro de um inseto.



Fonte: O autor

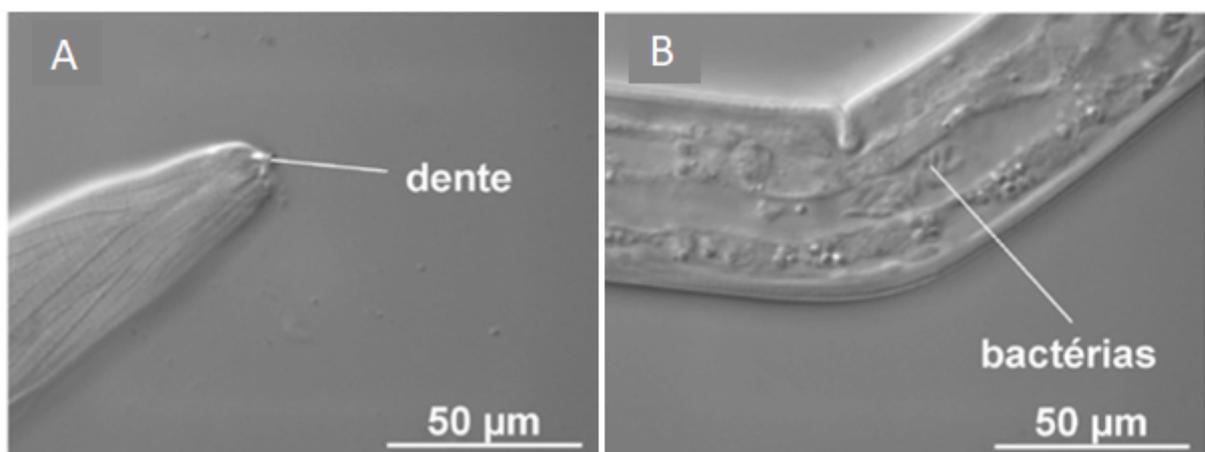
2.3.1 *Heterorhabditis bacteriophora*

Os nematoides pertencem a um grande filo de metazoários, um grupo numeroso e diversificado que tem um número médio de 100.000 a 1.000.000 de espécies (LAMBSHEAD, 1993). Morfologicamente, nematoides são descritos como vermes de corpo alongado, cilíndrico e geralmente pequenos (cerca de 2 mm) (WOOD, 1988). Nematoides de vida livre são amplamente encontrados em ambientes terrestres e aquáticos, e mostram-se resistentes às condições ambientais adversas (BUNDY, 1997).

Nematoides *Heterorhabditis* são classificados como entomopatogênicos, visto que causam doença e são letais para insetos que possuem alguma fase de vida terrestre (POINAR, 1990). Atualmente, sabe-se que NEPs são capazes de matar uma gama de artrópodes, incluindo até carrapatos (VASCONCELOS *et al.*, 2004). A infecção do hospedeiro se dá por uma fase larval de resistência do nematoide, chamada de JIs considerada a única fase do desenvolvimento encontrada no solo, ou seja, fora do corpo do inseto hospedeiro (WOOD, 1988). Tais estádios possuem duas cutículas e um dente córneo (Figura 6A), que possibilita que os JIs consigam penetrar percutaneamente o corpo do hospedeiro ou infectar estes mediante a penetração de orifícios naturais como boca, ânus e espiráculos respiratórios, sendo estas características exclusivas do gênero (ROSSI, 2014), Fato este que beneficia *Heterorhabditis* em relação aos demais gêneros, em especial *Steinernema*.

De modo geral, *Heterorhabditis* spp. edifica uma relação de simbiose do tipo mutualismo multipartido com bactérias (HUSSA; GOODRICH-BLAIR, 2013) do gênero *Photorhabdus* (Figura 6B). Tais bactérias ficam alojadas na porção anterior do intestino dos JIs (BOEMARE; AKHURST; MOURANT, 1993). Essa especificidade estabelecida entre as espécies durante simbiose se mantém através da Endotoquia Matricida, a qual consiste na eclosão de estádios larvais do nematoide a partir de ovos postos por fêmeas ainda dentro do seu corpo, contribuindo para a sua morte. Este processo garante que a simbiose seja espécie específica, uma vez que só é passada de uma geração a outra do NEP (LORDELLO, 1951).

Figura 6 - Fotomicrografia de contraste de interferência de Juvenis Infectantes de *Heterorhabditis*.



Fonte: Adaptado de Almenara *et al.*, 2010. (A) Região anterior com destaque para o dente córneo. (B) *Photorhabdus* sp. retida no interior do intestino.

O gênero *Photorhabdus* compreende em bactérias gram-negativas. Um estudo filogenético recente baseado em genomas sequenciados identificou pelo menos 19 espécies diferentes no gênero, sendo *Photorhabdus laumondii* subsp. *laumondii* TT01 a melhor cepa caracterizada no nível molecular (ADEOLU *et al.*, 2016). *Photorhabdus* antes considerada como parte da família Enterobacteriaceae, recentemente foi modificada e faz parte da família Morganellaceae (MACHADO *et al.*, 2018).

2.3.2 Controle com nematoides

O controle biológico é definido como a ação natural entre “agentes controladores” (parasitoides e patógenos microbianos) que mantêm uma população hospedeira em níveis mais baixos do que ocorreriam em suas ausências. São parasitos obrigatórios e possuem relação simbiote com bactérias entomopatogênicas (MONTEIRO *et al.*, 2012).

Monteiro *et al.* (2010) e Monteiro (2014) publicaram alguns estudos que validaram, em condições experimentais e de semicampo, o uso de *Heterorhabditis* spp. para o controle de carrapatos ixodídeos, que foi confirmado pela alta taxa de mortalidade da população-alvo, bem como pela redução da porcentagem de postura das fêmeas e da taxa de eclosão das larvas. Paralelamente, tem sido observado nos últimos anos um aumento no número de publicações que confirmam a suscetibilidade de gastrópodes a NEPs (TUNHOLI *et al.*, 2014, 2017; AMARAL *et al.*, 2021; VIDAL *et al.*, 2021).

Sobrinho *et al.* (2021) avaliaram a virulência de *H. bacteriophora* HP88 sobre larvas de *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) e constataram eficiência no método alternativo empregado para controle do muscídeo em questão. Os autores ainda ressaltaram que houve uma relação diretamente proporcional entre concentração NEPs/mortalidade em larvas de *S. calcitrans*.

A mesma espécie de nematoide aqui proposta foi testada por Monteiro *et al.* (2010) em *Rhipicephalus microplus* (Cnestrini, 1888), na concentração de 300 JIs/teleógena. Segundo tais autores, a exposição por 24h resultou na eficácia de 82,54% de mortalidade do carrapato, valor que chegou a 100% após exposição a 48h e 72h.

Leite *et al.* (2003) testaram cinco linhagens nativas de NEPs visando o controle de ninfas da cigarrinha das pastagens *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854), e relataram que *Heterorhabditis* sp. e *Steinernema glaseri* (Steiner, 1929) foram as espécies mais virulentas causando mortalidade de 84% após cinco dias de infecção. A espécie *H. baujardi* também foi efetiva sobre larvas do gorgulho da goiaba, *Conotrachelus psidii* (Marshall, 1922), segundo relato de Del Valle *et al.* (2008).

Os NEPs do gênero *Heterorhabditis* também apresentaram melhor desempenho no estudo realizado por Monteiro (2014), pois causaram uma redução superior a 99% na quantidade de ovos postos e de larvas eclodidas de *R. microplus*, quando comparado ao grupo exposto aos nematoides do gênero *Steinernema*. O autor ainda sugere que as bactérias do gênero *Photorhabdus* associadas a esses nematoides sejam mais letais para esses artrópodes.

Wilson, Glen e George (1993) e Wilson *et al.* (1995) verificaram em condições experimentais e de campo, a capacidade do nematoide malacopatogênico *Phasmarhabditis hermaphrodita* (Schneider, 1859) infectar e matar diferentes espécies de lesmas, sendo *Deroceras reticulatum* (Müller, 1774) um exemplo. Embora não seja classificado como NEP, seu mecanismo de ação demonstra alta similaridade, uma vez que atua como veiculador mecânico do endosimbionte *Moraxella osloensis*. Tais nematoides já estão disponíveis comercialmente na Europa, como agente moluscicida (Kaya, 2000).

Nas regiões em que o *P. hermaphrodita* não é comercializado, por não ser uma espécie presente na região, como nos Estados Unidos, seguem os bioensaios para a busca por outros agentes, como descreve Kaya (2000), que enfatiza que *Steinernema longicaudum* e *Heterorhabditis marelatus* são agentes potenciais para o controle da lesma do jardim, *D. reticulatum*, nesta região.

São poucos 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 *B. similis*, culminando com uma taxa de mortalidade de 55%, além de favorecer relevantes desordens fisiológicas no molusco hospedeiro.

Amaral *et al.* (2021) demonstraram que *B. glabrata* foi susceptível a infecção por *H. bacteriophora* e apesar da ausência de letalidade dos grupos expostos, a infecção gerou comprometimento no metabolismo glicídico, principalmente nas reservas de galactogênio.

O molusco *P. columella* mostrou-se susceptível a JIs de *H. baujardi* LPP7, segundo Tunholi *et al.* (2017). Para tais autores, a exposição dos limineídeos ao NEPs resultou em uma taxa de mortalidade de 66,66%. Em adição, todos os parâmetros reprodutivos foram alterados em decorrência da infecção, com decréscimo no número total de ovos, massas ovígeras e taxa de eclodibilidade embrionária, demonstrando a ocorrência do fenômeno de castração parasitária na população exposta.

Vidal *et al.* (2021) testaram o nematoide *H. baujardi* LPP7 em *P. columella*, em uma concentração de 75 JIs/molusco, por 24h. Segundo tais pesquisadores, interferências ligadas a biologia reprodutiva e alterações fisiológicas nos moluscos expostos foram demonstradas, tais como: o balanço energético negativo, aumento da atividade das enzimas relacionadas aos danos teciduais e acúmulo de compostos nitrogenados no molusco hospedeiro. Em adição, o fenômeno da redução de fecundidade precoce foi também estabelecido.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção e manutenção de *Pseudosuccinea columella*.

Os espécimes de *P. columella* foram obtidos a partir de uma colônia mantida no laboratório de Parasitologia do Hospital Veterinário do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUE-UFES). A confirmação dos exemplares foi a partir de dissecação e identificação morfológica realizada pela FIOCRUZ, baseado na metodologia de Paraense (1982).

Os moluscos foram acondicionados em aquários de vidro (12x24x14 cm) contendo água decolorada, argila esterilizada e suplementação à base de cálcio, 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 a necessidade.

3.2 Obtenção do nematoide *Heterorhabditis bacteriophora* HP88.

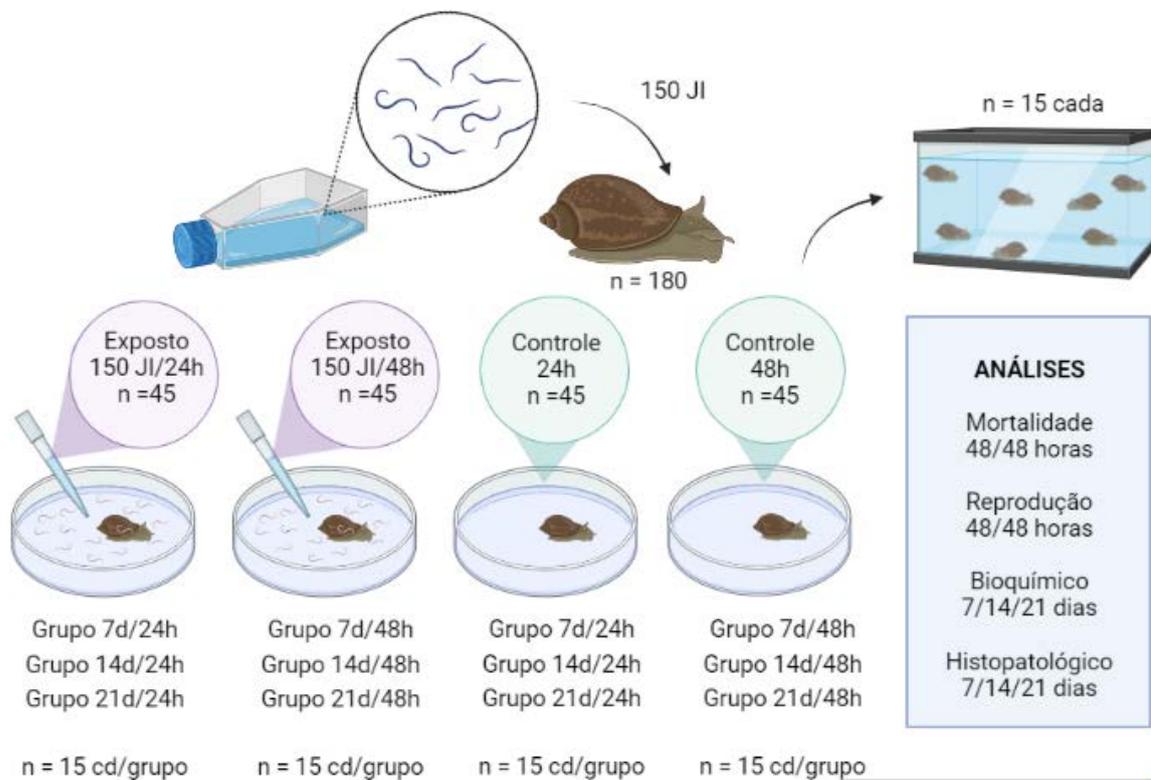
Os nematoides da espécie *H. bacteriophora*, linhagem HP88, foram cedidos pelo Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Rio de Janeiro, Brasil.

Para multiplicação dos NEPs, foram utilizadas lagartas de último instar de *Tenebrio molitor* (Linnaeus, 1758), cedido pelo Núcleo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Manejo Fitossanitário de Pragas e Doenças – NUDEMAFI UFES, seguindo a metodologia proposta por Lindegren, Valero e Mackeye (1993) e Kaya e Stock (1997). Os nematoides foram coletados logo após a saída da armadilha de White e foram acondicionados em garrafas de cultivo celular de 40 mL, acrescido de água destilada e rapidamente destinados ao uso.

3.3 Exposição experimental aos nematoides, formação dos grupos experimentais e manutenção dos moluscos.

Os grupos, controle e exposto, foram arranjados em dois fatores: tempo de exposição ao nematoide: 24 e 48 horas; e dias: sete, 14 e 21 dias, conforme mostra a figura 7.

Figura 7 - Representação dos processos envolvidos, durante os 21 dias de experimentação. Seleção dos materiais biológicos (moluscos e nematoides entomopatogênicos). Exposição experimental de *Pseudosuccinea columella* ao *Heterorhabditis bacteriophora* HP88.



Created in BioRender.com 

Fonte: O autor

Moluscos jovens (0,8-1,5 cm de concha), maduros sexualmente, foram separados por grupos em aquários de vidro. A infecção dos moluscos foi realizada conforme metodologia descrita por Tunholi *et al.* (2017). Para a infecção foi realizada tratamentos com nematoides, sendo quantificado o número de nematoides/mL, além da formação do grupo controle, exposto somente em água declorada, a 23°C durante 21 dias. Para obtenção das suspensões com nematoides, foi realizada contagem de 10 alíquotas de 15 μ L (ZIMMERMANN; LUTH; ESCH, 2013) obtidas a partir de 40 mL, na sequência foi ajustada para a concentração desejada de 150 JIs/molusco.

A exposição experimental ao nematoide se fez de forma individual utilizando placas de Elisa com 24 poços (modelo: K12-024/KASVI), fabricado em poliestireno, com volume máximo de 3,5 mL (16,25 mm x 17,3 mm). Para tanto, cada poço da placa foi previamente preenchido por água destilada acrescida com 150 JIs do nematoide, totalizando dois mL em cada poço. Feito isso, foi inserido um molusco por poço e 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 mantidas a 25-27°C e umidade de 85% por 24 ou 48h, conforme indicação de cada grupo.

Após exposição, os moluscos foram condicionados em aquários de vidro, conforme descrito no item 3.1, bem como os procedimentos padrão para a manutenção dos mesmos. Cada aquário albergou 15 moluscos. Todo experimento foi conduzido em duplicata, compreendendo quinze réplicas para cada repetição, feitas ao acaso, utilizando um N total de 360 moluscos.

As análises quanto a mortalidade e postura foram realizadas a cada 48h, até o fim da terceira semana de acompanhamento. Já para as análises bioquímicas e histológicas, as coletas de material foram realizadas ao final de cada semana, ou seja, com sete, 14 e 21 dias, pós-exposição. O delineamento temporal, de três semanas de avaliação, se deu a partir de trabalhos prévios realizados por Tunholi *et al.* (2017) e Vidal *et al.* (2021). E para garantir a permanência de 15 moluscos por grupo, foi conduzido em concomitante, para cada grupo experimental, um aquário com moluscos, nas mesmas condições, para reposição, após contabilizada a mortalidade. Essa metodologia se faz necessária, para garantir o volume necessário de tecido e hemolinfa para as análises bioquímicas e histológica, assim se evita a retirada de moluscos do grupo controle, ao passo que haja mortalidade no grupo exposto, a fim de manter a densidade populacional, fato necessário quando se avalia os aspectos reprodutivos, como foi adotado por Tunholi *et al.* (2017).

3.4 Dissecção e coleta da hemolinfa e tecidos.

A dissecção e coleta da hemolinfa (He) e tecidos de moluscos aconteceu conforme a metodologia de Tunholi *et al.* (2014, 2016) e Vidal *et al.* (2019). Ao fim de cada semana de avaliação: sete, 14 e 21 dias, 13 moluscos de cada grupo experimental (controle e exposto; 24 e 48h) foram dissecados para a coleta da hemolinfa (os outros 2 moluscos foram reservados para análise histológica), através da punção cardíaca, e coleta de tecidos: glândula digestiva (GD), glândula de albúmen (GA) e massa cefalopédica (MC), sendo os materiais biológicos mantidos a -80°C

até a utilização para análises bioquímicas. Todas as amostras foram mantidas em banho de gelo durante as dissecações.

As análises bioquímicas dos tecidos mencionados foram realizadas em parceria com o laboratório de Biologia Celular e Molecular, do Departamento de Ciências Farmacêuticas, da Faculdade Multivix. 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) e cálcio.

3.5 Análises das alterações bioquímicas em *Pseudosuccinea columella* exposta ao nematoide *Heterorhabditis bacteriophora* HP88

3.5.1 Metabolismo dos carboidratos.

A concentração hemolinfática de glicose livre foi realizada pelo método da glicose oxidase, utilizando kits para diagnóstico (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). A determinação do conteúdo de glicogênio estocados nos tecidos da MC e GD, foi feito de acordo com Pinheiro e Amato (1994), através do método 3,5 dinitro salicilato (DNS) adaptado, tendo seus resultados expressos em mg de glicose/g de tecido, peso fresco (VIDAL, *et al.*, 2019).

3.5.2 Determinação de proteínas totais (PTT)

Este ensaio foi realizado de acordo com a técnica do Biureto, descrita por Weichselbaum (1946). Uma mistura de 50mL de hemolinfa e 2,5 mL do reagente de Biureto (citrato trissódico 0,114M, carbonato de sódio 0,21M, e sulfato de cobre 0,01M) foi homogeneizado, e deixado sob temperatura ambiente e após cinco minutos as leituras foram realizadas em espectrofotômetro 550 nm (TUNHOLI-ALVES *et al.*, 2011) e os resultados expressos como g/dL.

3.5.3 Determinação de ácido úrico e ureia.

A determinação hemolinfáticas dos conteúdos dos produtos nitrogenados de degradação (ácido úrico e ureia) foi realizada através de Kits comerciais, conforme descrito por Tunholi-Alves *et al.* (2011).

O procedimento consistiu em 50 µL de hemolinfa 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 absorbância, respectivamente, tendo os resultados expressos em mg/dL (BISHOP; ELLIS; BURCHAM, 1983; CONNERTY; BRIGGS; EATON, 1955).

3.5.4 Determinação das atividades da aspartato aminotransferase (AST) e da alanina aminotransferases (ALT)

As determinações das atividades das AST e ALT foram realizadas conforme Tunholi *et al.* (2011) e Tunholi-Alves *et al.* (2011). 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 -cetogluturato e tampão fosfato de sódio a 0,1 M pH 7,4 a 37°C durante 5 minutos. Em seguida, 100 μ L (para ALT) e 200 μ L (para AST) de hemolinfa foram homogeneizados e novamente incubados a 37°C, por 30 minutos. Posteriormente, 50 μ L 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).

3.6 Histologia de *Pseudosuccinea columella* expostas ao nematoide *Heterorhabditis bacteriophora* HP88.

Ao fim de cada semana de análise, sete, 14, 21 dias, dois moluscos de cada grupo (controle e exposto) foram dissecados com o auxílio de uma pinça e as partes moles colocadas em eppendorf contendo formalina 10%, por 24h, e transferidas para álcool 70%, onde se manteve até ser processada, baseadas segundo as técnicas de fixação e processamento descritas por Vidal *et al.* (2019). Foi aplicado o processamento histológico de Humason (1979) com coloração de hematoxilina-eosina (HE), Tricrômico Masson e Periodic acid-reactive Schiff (PAS). As imagens foram capturadas através do microscópico Optacam Microscopy Technology 055R LOP14003.

3.7 Análise da mortalidade e taxa ovipositória de *Pseudosuccinea columella* exposta ao nematoide *Heterorhabditis bacteriophora* HP88.

Os grupos experimentais foram divididos em 12 subgrupos constituídos de 15 moluscos cada, acondicionados em aquários respectivos, sendo seis correspondentes ao grupo exposto por 24h (exposto e controle) e seis ao grupo exposto por 48h (exposto e controle). Em dias alternados, até o fim de cada semana de avaliação, a mortalidade e os números de ovos postos foram contabilizados através da observação direta conforme descrito por Tunholi *et al.* (2014, 2017). E a cada molusco retirado do grupo experimental que veio a óbito, este foi substituído por outro molusco do seu respectivo aquário de reposição, que fora mantido nas mesmas

condições. Após a contagem dos números de ovos, as placas foram alocadas em novos aquários para acompanhamento do desenvolvimento do embrião até a eclosão.

3.8 Análise dos dados

Para comparação dos parâmetros bioquímicos e reprodutivos, os dados foram primeiro submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk, seguido da análise de variância ANOVA e comparação das médias pelo teste t. Todos cálculos estatísticos foram realizados com o programa GraphPad Prism 9 ($P < 0,001$) e apresentados quanto a média \pm desvio padrão, os dados bioquímicos; e quanto a média \pm erro padrão, os reprodutivos. O resultado da mortalidade foi obtido a partir somatório dos moluscos que vieram a óbito, somado aos que foram substituídos, que estavam sob as mesmas condições, no grupo de reposição, até o final da terceira semana, assim como a média das duas repetições, e apresentados em porcentagem, por meio da taxa de mortalidade acumulada. A avaliação histopatológica foi realizada a partir das análises descritivas dos dados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nematoides entomopatogênicos têm sido amplamente utilizados como agentes biológicos para o controle de uma variedade de organismos de interesse médico e veterinário. Recentemente, estudos demonstraram a patogenicidade de NEPs para espécies de caramujos, demonstrando alterações biológicas, histológicas e fisiológicas nas interfaces molusco/nematóide (BONFIM *et al.*, 2014; LIMA *et al.*, 2017; TUNHOLI *et al.*, 2017; VIDAL *et al.*, 2021; AMARAL *et al.*, 2022).

4.1 Alterações bioquímicas em *Pseudosuccinea columella* expostas a *Heterorhabditis bacteriophora* HP88

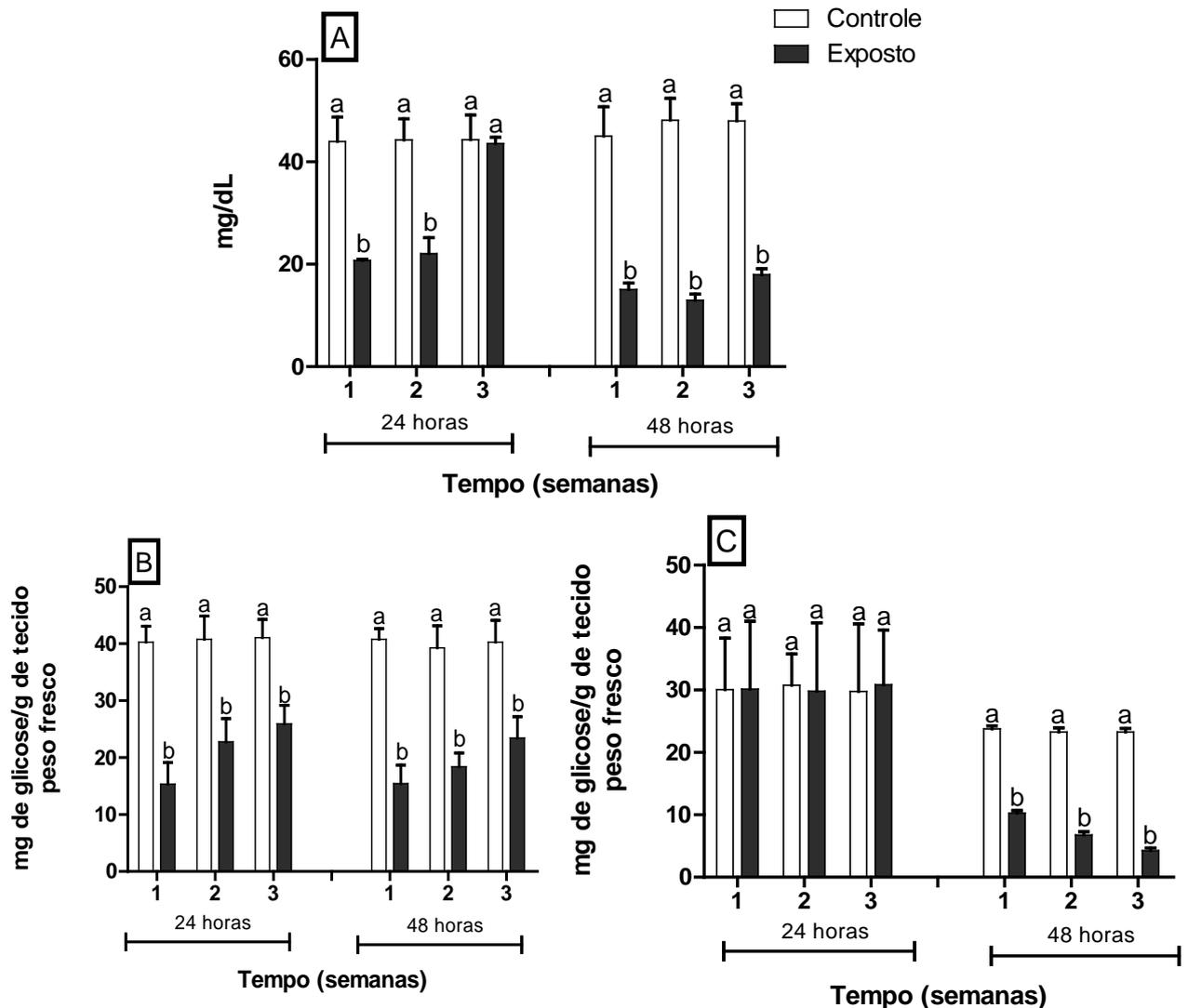
Em condições normais, o metabolismo oxidativo de moluscos/gastrópodes é dependente de vias aeróbias baseado principalmente no consumo de glicose. No entanto, quando submetidos a condições adversas, observa-se o acionamento de

outros substratos (proteínas e lipídios), resultando em profundas alterações na composição hemolinfática.

Os resultados do presente estudo revelaram alterações neste metabolismo oxidativo de *P. columella* durante exposição por *H. bacteriophora*. Essas alterações foram observadas ao longo das três semanas de análise, afetando tanto os conteúdos de glicose na hemolinfa quanto as reservas polissacarídicas (glicogênio) estocadas na glândula digestiva e massa cefalopediosa. A concentração de glicose na hemolinfa de moluscos expostos por 24h, foi inferior ao seu respectivo grupo controle, na primeira ($20,74 \pm 0,26$ mg/dl) e segunda semana ($22,09 \pm 3,08$ mg/dl), se restabelecendo na terceira semana, em níveis semelhantes ao controle. Essa mesma tendência, de queda das reservas energéticas nos moluscos expostos, foi mantida para o grupo 48h, destacando a segunda semana que registrou menor valor ($12,95 \pm 1,20$ mg/dl); contudo, este grupamento exposto por 48h, não foi capaz de restabelecer em nenhum momento avaliado, a glicemia em relação ao controle, como foi observado com 24h (Figura 10A).

Quanto as reservas de glicogênio encontradas na glândula digestiva de *P. columella* a exposição aos NEPs induziu decréscimo significativo em ambos os grupos estudados (Figura 10B). No entanto, ao analisar o impacto da exposição nas concentrações dessa reserva na massa cefalopediosa, apenas o grupo de 48h apresentou diferença significativa com o grupo controle (Figura 10C).

Figura 8 - Relação estabelecida entre as concentrações de glicose na hemolinfa (A) glicogênio na glândula digestiva (B) e massa cefalopediosa (C) de *Pseudosuccinea columella* exposto experimentalmente por *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 ao longo de 3 semanas. (a, b) indica que as médias diferem significativamente entre si. $p < 0,0001$.



Esses resultados mostram que houve intensa demanda energética, sugerindo ser resultante da presença dos nematoides e fez com que os moluscos ativassem a via de degradação aeróbica dos carboidratos para obter energia, na tentativa de manter a homeostase. Resultados similares foram verificados por Lima *et al.* (2017) ao analisarem a influência da exposição de *A. cantonensis* em *B. straminea* e *B. tenagophila*, um molusco também dulcícola. Segundo tais autores, o esgotamento das reservas de polissacarídeo verificado nos moluscos expostos ocorrera em resposta ao aumento da retirada de nutrientes da hemolinfa, principalmente de glicose livre pelos estádios larvais do metastronquídeo em questão. Bonfim *et al.* (2020) também

relataram as mesmas alterações fisiológicas em *B. glabrata* coinfectada experimentalmente por *A. cantonensis* e *E. paraensei*.

Contudo, o grupamento exposto por 24h foi capaz de restabelecer suas concentrações de glicose, semelhante ao controle, na terceira semana de análise, sugerindo assim a existência de mecanismos homeostáticos envolvidos no controle da glicemia, por parte dos moluscos, que foram capazes de se adaptar a exposição, dado como uma plasticidade metabólica dos mesmos, já descrita por Thompson e Lee (1986), mesmo quando parasitados. Tunholi-Alves *et al.* (2013) trazem que os moluscos direcionam a glicose, quando em excesso na hemolinfa, para a síntese de reservas polissacarídicas, denominadas de glicogênio e galactogênio, que passam a ser estocadas em tecidos especializados, como a glândula digestiva, a massa cefalopediosa (glicogênio) e a glândula albuminosa (galactogênio). E quando o molusco é submetido a condições fisiológicas estressantes, como o parasitismo, a glicose circulante diminui, as reservas de glicogênio são mobilizadas, e quando não suficiente, os padrões oxidativos mudam, resultando na gliconeogênese e ativação de vias anaeróbias (TUNHOLI *et al.*, 2013; TUNHOLI-ALVES *et al.*, 2014)

Tal fato ocorreu no presente trabalho, onde ao se observar a baixa concentração glicêmica na hemolinfa dos moluscos expostos, nas duas primeiras semanas de análise, aconteceu concomitante a mobilização da reserva de polissacarídeo do tecido, a glândula digestiva, contribuindo para que a glicemia voltasse a oscilar próximo ao controle na terceira semana, ou seja, a medida que reduziu glicose na hemolinfa, o mecanismo homeostáticos evoluiu para a normalização, ativando a glicogenólise, principalmente na glândula digestiva; e sendo esta suficiente, não se fez necessário a mobilização de carboidratos da massa cefalopediosa, outro sítio de estoque de glicogênio.

Já quando se analisa o grupo exposto por 48h, observa-se que houve mobilização de glicogênio, tanto de glândula digestiva, quanto de massa cefalopediosa, mas não foi suficiente. Assim, sugere-se que a quebra da homeostase glicêmica no grupo de 48h, pode ter sido decorrente de uma maior competição por nutrientes, visto que o hospedeiro ficou em contato por mais tempo com os nematoides, isto pode ter possibilitado que mais nematoide penetrasse em relação ao grupo de 24h, apesar da concentração de nematoides desafiada ter sido a mesma, sugerindo que o padrão de resposta pode ser dependente do tempo de exposição ao nematoide e categorizando que o complexo bactéria/nematoide, podem ter se

beneficiado dos monômeros de açúcar do molusco hospedeiro. Fato este também elucidado nas análises histopatológicas, a serem apresentadas adiante, principalmente na glândula digestiva, denotando o comprometimento funcional do tecido, de sintetizar e estocar polissacarídeos.

Condição similar foi verificada Amaral *et al.* (2021, 2022) ao observarem redução significativa nos conteúdos de glicose após infecção por *H. bacteriophora* em *B. glabrata*. Estes autores reforçam que tais achados resultam da competição direta por nutrientes entre o molusco hospedeiro e o complexo nematoide/bactéria, uma vez que estudos *in vitro* têm confirmado a habilidade da bactéria endossimbiótica, *P. luminescens*, em usar glicose como substrato energético, favorecendo o estado de hipoglicemia (JEFFKE *et al.*, 2000). Também descrito por Gil, Choo e Gaugler (2002), no qual a taxa de crescimento de *H. bacteriophora* aumentou significativamente quando os meios de cultura foram suplementados com glicose em comparação com os meios não suplementados.

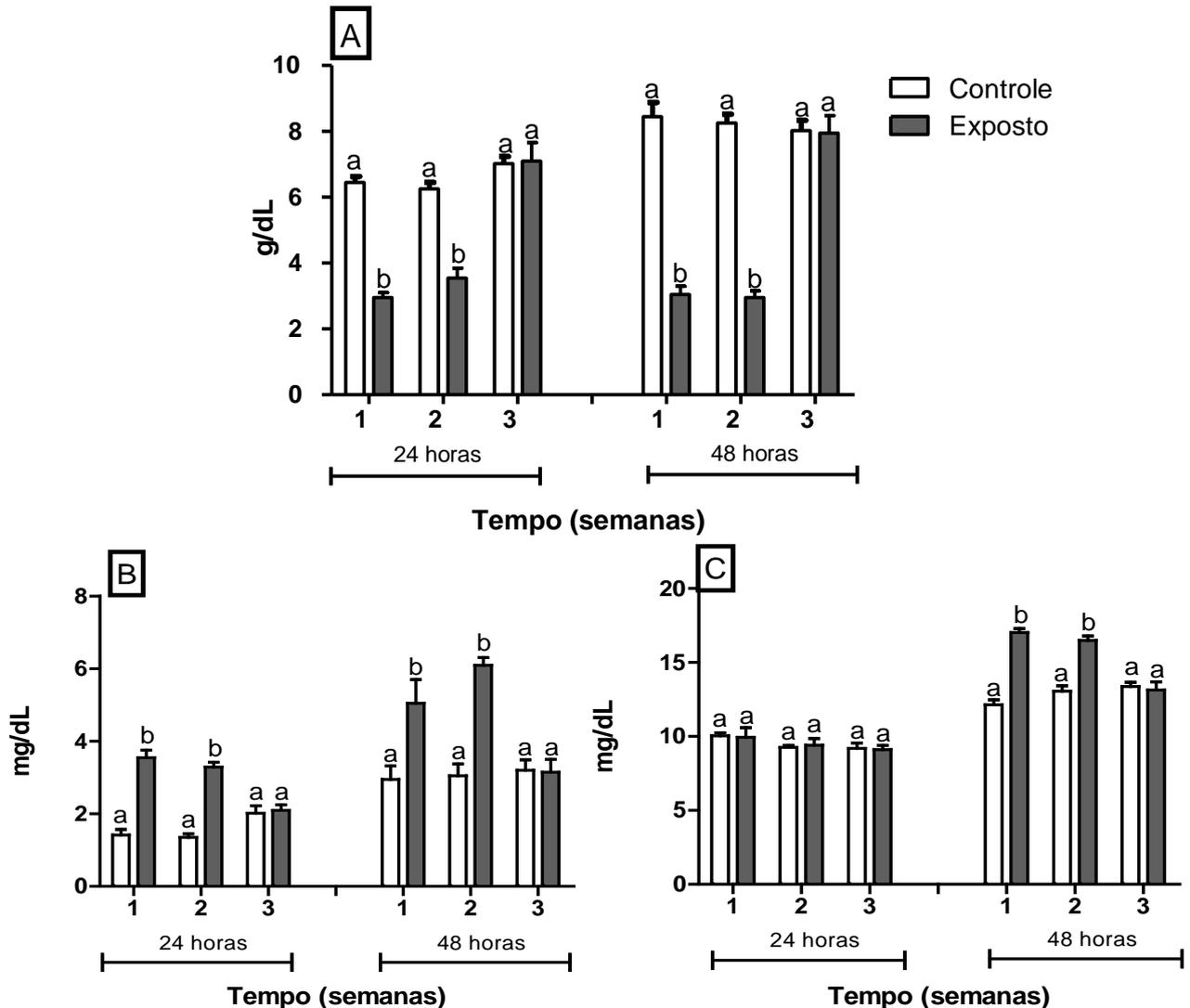
Instaurado o balanço energético negativo, além da gliconeogênese, os moluscos recorrem ao catabolismo proteico, considerada uma fonte secundária de energia. Sabendo disso, foi feita a dosagem de proteína total (PTT), assim como os produtos nitrogenados gerados do processo de transaminação: ácido úrico e ureia, da hemolinfa dos moluscos. A exposição aos NEPs, por 24h, induziu redução de 54,26% da PTT, ao final da primeira semana ($2,95 \pm 0,15$ g/dL), diferindo significativamente do grupo controle ($6,45 \pm 0,18$ g/dL). Essa tendência foi mantida na segunda semana de exposição, com decréscimo de 43,2% ($3,55 \pm 0,18$ g/dL) em relação ao grupo não exposto ($6,25 \pm 0,20$ g/dL). No entanto, a partir da terceira, houve uma normalização nos conteúdos do substrato, com o grupo exposto ($7,10 \pm 0,55$ g/dL) oscilando próximo ao grupo controle ($7,02 \pm 0,22$ g/dL) (Figura 8A).

Para os grupos expostos por 48h, a exposição também resultou em decréscimo de 64,24% nas concentrações de PTT, tanto na primeira ($3,05 \pm 0,25$ g/dL) quanto na segunda semana, com 63,21% ($2,95 \pm 0,20$ g/dL) diferindo de forma significativa do grupo não exposto ($8,45 \pm 0,43$ g/dl e $8,25 \pm 0,27$ g/dl), respectivamente. Na terceira semana de estudo, similarmente ao reportado para o grupo 24h, não houve diferença significativa entre exposto ($7,95 \pm 0,53$ g/dl) e controle ($8,02 \pm 0,32$ g/dl), sugerindo a existência de mecanismos homeostáticos envolvidos no controle dessa molécula (Figura 8A).

As alterações observadas no metabolismo de produtos nitrogenados, quanto a ureia, acompanha o que foi descrito para as proteínas, em relação ao tempo, onde se obteve o aumento durante as duas primeiras semanas, ambos os grupos: 24 e 48h. Os valores registrados na primeira semana foram de $3,55 \pm 0,21$ mg/dL (24h) e $5,05 \pm 0,65$ mg/dL (48h) grupo exposto e $1,42 \pm 0,15$ mg/dL (24h) e $2,95 \pm 0,33$ mg/dL (48h) do grupo controle. Na segunda semana ($3,29 \pm 0,13$ mg/dL e $6,10 \pm 0,21$ mg/dL), indicando aumento de 143% e 100%, em relação ao grupo controle ($1,35 \pm 0,10$ mg/dL e $3,05 \pm 0,37$ mg/dL), não havendo significância estatística na terceira semana de ambas exposições (Figura 8B).

Para os conteúdos de ácido úrico, não houve diferença significativa no grupo 24h. No grupo 48h, alterações na concentração deste substrato foram verificadas apenas no início da exposição sendo normalizada na terceira semana do estudo. Como principais resultados, a exposição por *H. bacteriophora* resultou em acréscimo de 40% na primeira semana ($17,02 \pm 0,27$ mg/dL), e 23,35% ($16,49 \pm 0,31$ mg/dL) na segunda semana, diferindo significativamente do grupo controle ($12,15 \pm 0,33$ mg/dL e $13,05 \pm 0,37$ mg/dL) (Figura 8C).

Figura 9 - Relação estabelecida entre as concentrações de proteínas totais (A) ureia (B) e ácido úrico (C) na hemolinfa de *Pseudosuccinea columella* exposto experimentalmente por *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 ao longo de 3 semanas. (a, b) indica que as médias diferem significativamente entre si. $p < 0,0001$.



O balanço energético negativo, implica em ativação de mecanismos compensatórios que resultam, além da fonte energética, a produção de produtos nitrogenados, que devem ser excretados pelo molusco. Este processo foi observado por Tunholi *et al.* (2011) e Tunholi-Alves *et al.* (2015), os quais relataram que após condição fisiológica adversa, como parasitismo, os moluscos passam a utilizar fontes carbonadas não glicídicas como substratos energéticos, ativando vias bioquímicas alternativas, como a proteólise, contribuindo para o aumento das concentrações hemolinfáticas de ureia e ácido úrico.

A baixa concentração de proteínas na hemolinfa, além do catabolismo proteico como tentativa do molusco em restabelecer a normoglicemia, pode ser decorrente de

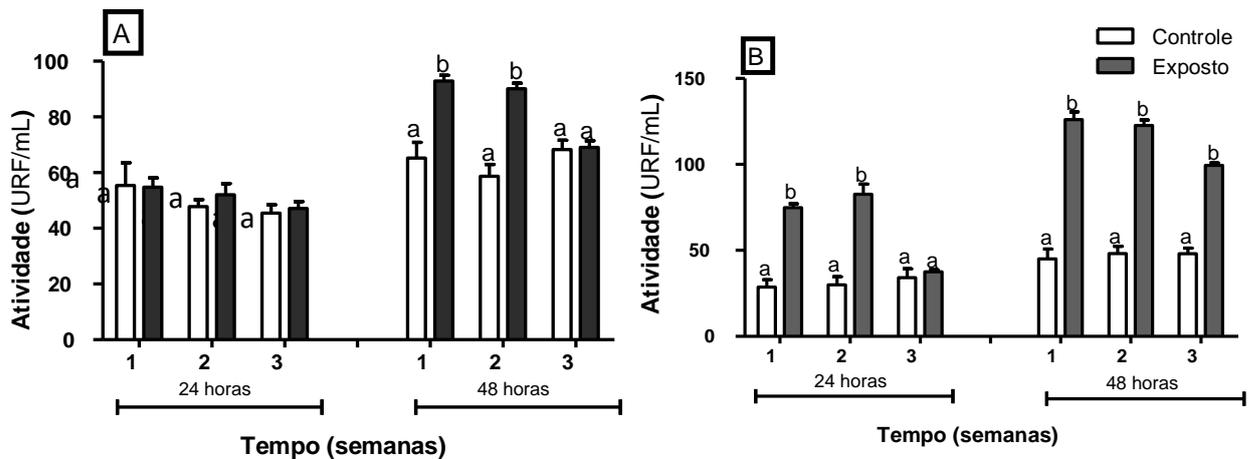
uma competição direta, pelos nematoides, onde estes estariam absorvendo aminoácidos como fonte energética, além dos monômeros de açúcar, como já foi observado por Gress e Cheng (1973) em *B. glabrata* infectadas por *S. mansoni*. Além disso, o significativo declínio nos níveis hemolinfáticos de proteína podem estar fortemente relacionados com o prejuízo histológico observado na glândula digestiva destes hospedeiros, uma vez que, representa o principal sítio de síntese deste substrato. Backry (2009) apresentou dados em sua pesquisa com *B. alexandrina* infectadas por *S. mansoni* que corroboram com os dados obtidos neste estudo.

Quanto a produção, acúmulo e excreção dos compostos nitrogenados, resultantes dessa via proteolítica, sabe-se que os moluscos aquáticos apresentam um padrão uricotélico de excreção, pois o ácido úrico tem a vantagem de poder ser excretado com pequena perda de água, passam a adotar o padrão ureotélico, uma vez que a ureia é menos tóxica e demanda de menos ATP para a excreção, sendo esta característica fundamental neste cenário de balanço energético negativo. E tal condição foi observada na hemolinfa do grupo exposto por 24h, pois o aumento da ureia ocorreu em paralelo com a desaminação de aminoácidos, confirmada com a redução dos níveis de proteínas, ou seja, houve uma inversão do padrão excretor de uricotélico para ureotélico. Pinheiro, Maldonado e Lanfredi (2009) relataram que quando se verifica a inversão do padrão uricotélico para ureotélico em moluscos infectados sugere-se uma capacidade adaptativa do hospedeiro. O mesmo não acontece com o grupo exposto por 48h, ou seja, mesmo com a tentativa de inversão do padrão excretor, não tendeu a normalidade, uma vez que a demanda energética foi maior, gerando mais compostos nitrogenados, do que a capacidade do metabolismo do molusco em dar vazão aos mesmos.

Paralelo a mensuração de PTT, foram quantificadas as aminotransferases: alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), pois são um grupo de enzimas que desempenham um papel no processo de transaminação dos aminoácidos, ressaltando a importância dessas enzimas na manutenção do *status* energético do gastrópode. No grupo 48h, a ALT aumentou significativamente até o final da segunda semana de exposição ($92,86 \pm 2,13$ URF/mL primeira semana; $90,09 \pm 2,03$ URF/mL segunda semana), diferindo do grupo controle ($65,2 \pm 5,73$ URF/mL; $58,71 \pm 4,27$ URF/mL, respectivamente), diferente do grupo de 24h, não houve diferença estatística em nenhuma semana de avaliação (Figura 9A). Quanto ao AST observou-se diferença estatística nas três semanas de avaliação do grupo de 48h, porém quanto

ao grupo de 24h, houve diferença apenas nas duas primeiras semanas ($74,76 \pm 2,26$ URF/mL; $82,67 \pm 5,94$ URF/mL), tendo os valores de normalidade, recuperado na terceira semana pós-exposição, comparado ao controle (Figura 9A).

Figura 10 - Relação estabelecida entre as atividades da alanina aminotransferase (ALT) (A), aspartato aminotransferase (AST) (B) na hemolinfa de *Pseudosuccinea columella* exposto experimentalmente por *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 ao longo de 3 semanas. (a, b) indica que as médias diferem significativamente entre si. $p < 0,0001$.



O aumento da atividade dessas enzimas pode estar relacionado com o direcionamento dos esqueletos de carbono, obtidos mediante a desaminação de aminoácidos, para a síntese de uma nova glicose. Cenário fisiológico similar foi descrito por Tunholi-Alves *et al.* (2015) ao estudarem a interface *Achatina fulica*/*A. cantonensis*.

Pinheiro, Gomes e Chagas (2001), estudando o efeito da infecção por *E. coelomaticum* em *B. similis*, também notaram elevação das atividades das aminotransferases no hospedeiro intermediário. Segundo estes autores, tais alterações provavelmente decorreram do aumento da taxa da gliconeogênese, contribuindo de certo modo para a redução das concentrações de proteínas totais e acúmulo de produtos nitrogenados de excreção em moluscos expostos. Sendo assim, pode-se afirmar que situação similar ocorreu neste estudo.

Estas enzimas atuam também como biomarcadores de lesão celular em gastrópodes (TUNHOLI-ALVES *et al.*, 2012). Assim, o aumento da atividade das transaminases pode ainda estar atrelada a injúrias teciduais causadas provavelmente pela migração dos estádios larvais dos nematoides no hospedeiro, condição está visualizada nos achados histológicos, através da desorganização tecidual.

4.2 Avaliação da mortalidade e da biologia reprodutiva de *Pseudosuccinea columella* expostos a *Heterorhabditis bacteriophora* HP88

A exposição experimental aos 150 JIs de *H. bacteriophora* HP88 induziu mortalidade em *P. columella*, sendo esta observada nos diferentes tempos de exposição. Dentre os grupos experimentais, aquele constituído por moluscos expostos por 48h obteve maior taxa de mortalidade acumulada (65,52%) quando comparado o grupo controle (14,94%), conforme apresentado na tabela 1.

TABELA 1 - Taxa da mortalidade acumulada de *Pseudosuccinea columella* exposto experimentalmente por *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 ao longo de 3 semanas.

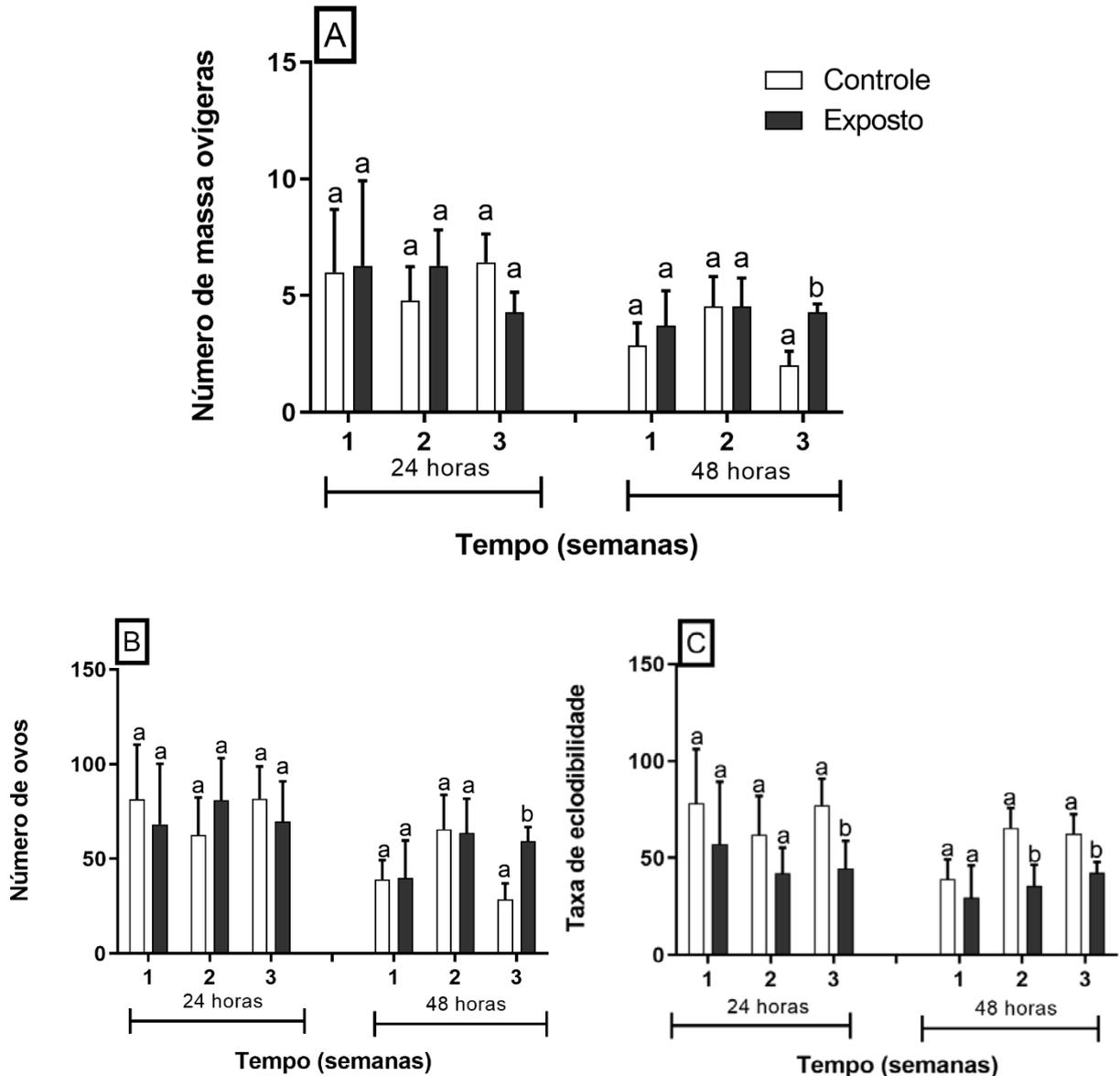
Parâmetros (%)	Dias	24 horas		48 horas	
		Controle	Exposto	Controle	Exposto
Taxa de mortalidade acumulada	7	4,55	6,06	14,52	51,61
	14	17,65	41,18	20,73	63,41
	21	18,97	48,28	14,94	65,52

Tais achados estão de acordo com aqueles referenciados por Tunholi *et al.* (2017), os quais observaram que a exposição de *P. columella* a JIs de *H. baujardi* LPP7 resultou em uma taxa de mortalidade de 66,66%, valor este bem próximo ao obtido no fim da terceira semana de análise, no grupo exposto por 48h (65,62%), assim como a alteração de todos os parâmetros reprodutivos em decorrência da exposição. Lima *et al.* (2017), observaram mortalidade de 10,7% de *B. tenagophila* após 21 dias de infecção por *A. cantonensis* e 18,14% em *B. straminea*; Tunholi *et al.* (2014) relataram 55% de mortalidade de *B. similaris* exposta ao *H. indica* LPP1. Segundo estes autores, após a penetração dos JIs no hospedeiro, o nematoide *Heterorhabditis* libera bactérias endossimbiontes pertencentes ao gênero *Photorhabdus* na hemocele do organismo hospedeiro, onde essas bactérias se replicam e liberam toxinas, causando septicemia.

Quanto as alterações reprodutivas, a avaliação quantitativa das massas ovíferas, bem como de ovos postos por moluscos, além da taxa de eclodibilidade embrionária, tanto dos moluscos expostos quanto os não expostos aos NEPs foram avaliados durante os 21 dias, e os valores encontram-se representados na figura 11.

Quando se observam os valores relacionados ao quantitativo de massas ovígeras de ambos os grupos experimentais, percebe-se que houve diferença estatística apenas na terceira semana de exposição para o grupo exposto por 48h ($4,28 \pm 0,36$) em relação ao seu respectivo grupo controle ($2,00 \pm 0,62$), demonstrando aumento de 53,27% (Figura 11A). Mesma tendência de variação foi demonstrada para o número de ovos postos ($59,71 \pm 7,39$ no grupo exposto e $28,50 \pm 8,60$ no grupo controle) (Figura 11B). Porém, quando avaliou a taxa de eclodibilidade embrionária, diferença estatística foi verificada tanto para o grupo exposto por 24 h ($44,65 \pm 14,16$) ao final da terceira semana de análises, comparado ao controle ($77,30 \pm 13,48$); quanto para o grupo 48 h na segunda ($35,73 \pm 10,88$) e terceira ($42,48 \pm 5,50$) semana de avaliação, comparado ao controle ($65,60 \pm 10,20$; $62,52 \pm 10,10$ respectivamente) (Figura 11 C) sendo possível sugerir que o fator tempo de exposição influenciou em maiores prejuízos reprodutivos, quando exposto por 48h ao nematoide *H. bacteriophora* HP88.

Figura 11 - Relação estabelecida entre o número de massas ovíferas (A); Número de ovos (B) e Taxa de eclodibilidade (C) de *Pseudosuccinea columella* exposto experimentalmente por *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 ao longo de 3 semanas. (a, b) indica que as médias diferem significativamente entre si. $p < 0,0001$.



A análise do número de massas ovíferas revelou que não houve diferença estatística entre os grupos expostos (24 e 48 h) com seus respectivos grupos controle no decorrer de todo o estudo, exceto ao final da terceira semana para moluscos expostos por 48h, onde se verificou aumento da taxa ovipositória. Este comportamento foi descrito por Minchela (1985), o qual denominou como fenômeno de compensação da fecundidade, condição na qual o animal parasitado eleva seus esforços reprodutivos a fim de compensar as perdas futuras que ocorrerão em decorrência do parasitismo, embora a autora tenha relatado tal acontecimento logo nas primeiras semanas pós-exposição, os dados obtidos por Brumpt (1941)

corroboram com o presente estudo, uma vez que as alterações reprodutivas se deram mais tardiamente em *B. glabrata* infectada por *S. mansoni*. Tais afirmativas vão de encontro ao que foi observado no presente estudo, os moluscos aumentaram a postura, como um mecanismo ecológico, na tentativa de compensar a redução da eficiência reprodutiva decorrente da exposição e do balanço energético negativo a se instaurar. O que difere do que foi observado por Amaral *et al.* (2022), ao submeter *B. glabrata* ao *H. bacteriophora* HP88, o mesmo nematoide aqui proposta, em outro molusco dulcícola, por 24h, onde descreveram uma redução significativa, em relação ao controle, do número de massas ovíferas e ovos. Assim também relataram Pinheiro e Amato (1995), uma redução de 96,32% do número total de ovos colocados por *B. similis* infectados com *E. coelomaticum*.

Contudo, quando se analisa a taxa de eclodibilidade é possível notar que as posturas dos moluscos expostos ao NEP não foram capazes de chegarem a termo, na terceira semana do grupo de 24h e nas duas últimas semanas do grupo de 48h, diferindo estatisticamente do seus respectivos grupo controle, revelando que as desordens bioquímicas, principalmente quanto ao mecanismo energético, uma vez que o fluido peri-vitelínico, responsável pela nutrição dos embriões, é constituído basicamente por proteínas e galactogênio, este sintetizado pela glândula albuminosa, que também foi afetada a nível de tecido, como mostra na histologia.

Nesse sentido, Tunholi-Alves *et al.* (2012) caracterizou que a diminuição dos parâmetros reprodutivos de *B. glabrata* quando parasitadas por *A. cantonensis*, tratava-se de castração parasitária, indireta e parcial, pois houve redução em todos os parâmetros analisados (número total de ovos, número de massa ovíferas, número de ovos/massa ovígera, número de ovos/molusco, porcentagem de ovos viáveis e conteúdo de galactogênio na glândula albuminosa) e atribuiu esse comportamento uma consequência do esgotamento das reservas energéticas do molusco hospedeiro. Assim também descreve Tunholi *et al.* (2017) para *P. columella* infectados por *H. baujardi* LPP7 e Amaral *et al.* (2022) com *B. glabrata*/*H. bacteriophora* HP88, ambos corroborando com os resultados evidenciados nesta pesquisa.

Esse processo de redução da fecundidade, foi observado, no presente estudo, após o esforço reprodutivo, da compensação parasitária, com aumento na produção de massa ovíferas e ovos, porém com menor disponibilidade de substratos a serem usados por embriões. Assim, a medida que o período de exposição progredia, a taxa de eclodibilidade dos embriões diminuía. Portanto, o processo de redução de

fecundidade em *P. columella* foi devido ao esgotamento energético, evidenciada pelos parâmetros bioquímicos, somada as baixas reservas de glicogênio, marcado pela coloração de PAS na histologia, somado a atrofia do tecido da glândula de albúmen, assim como a observação da região do ovotestes, constatando um número menor de células reprodutivas femininas.

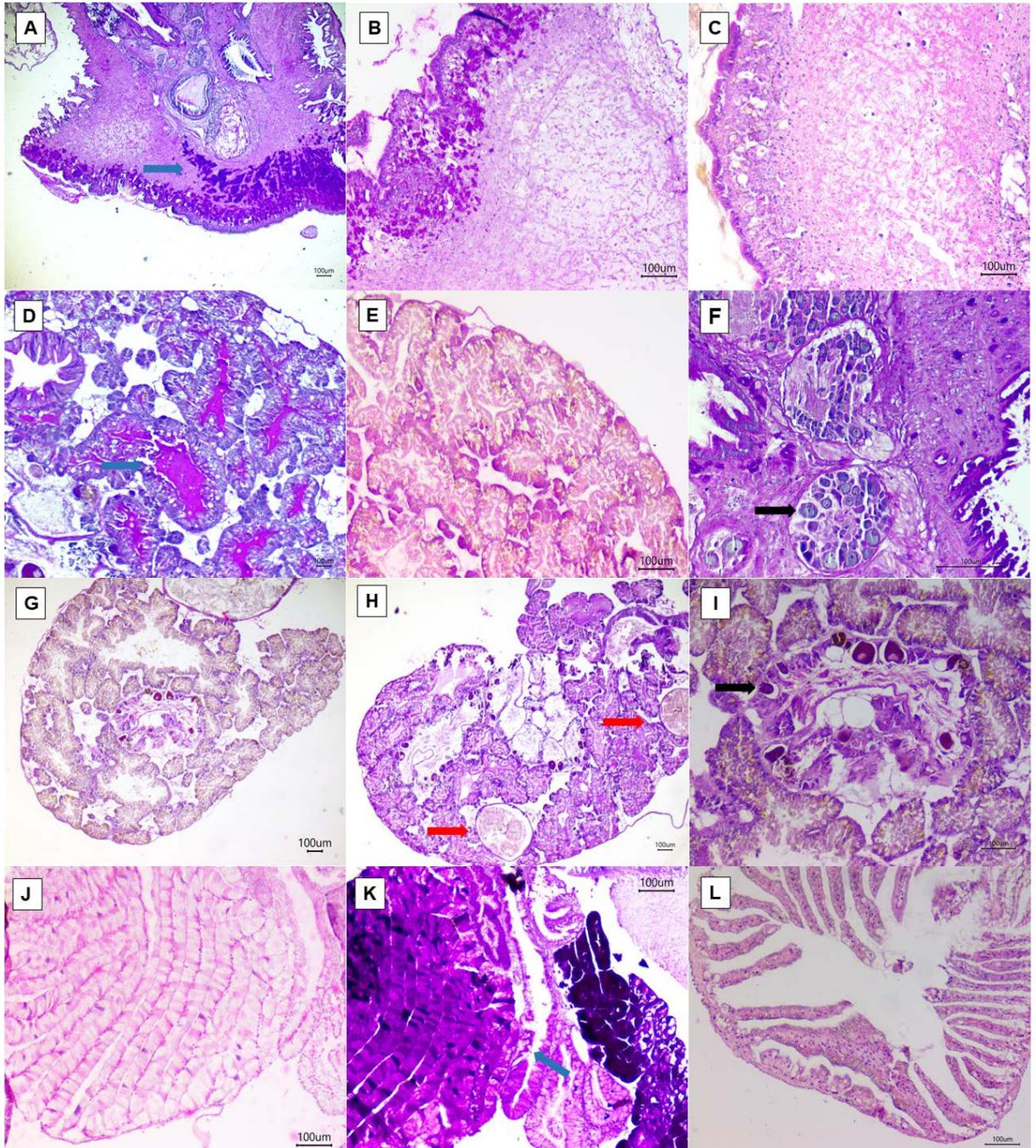
A presença destes dois postulados: compensação parasitária e redução da fecundidade também foi descrito por Lima *et al.* (2017), ao estudarem a biologia reprodutiva de *B. straminea* e *B. tenagophila* exposto por *A. cantonensis*.

4.3 Alterações histológicas de *Pseudosuccinea columella* expostos a *Heterorhabditis bacteriophora* HP88

Na avaliação histopatológica dos moluscos do grupo controle foram observados: o manto, constituído por fibras de colágeno e tecido conjuntivo (Figura 12 A); a glândula digestiva e seus ácinos organizados em lóbulos (Figura 12 D e E); no ovotestes foram observadas as células reprodutivas femininas (ovogônias) e masculinas (espermatogônias) em desenvolvimento e produção de embriões (Figura 12 F); a glândula de albúmen (Figura 12 J e K). Em adição, a presença de glicogênio foi fortemente marcada, através da coloração de PAS (Periodic acid-reative Schiff) conforme demonstrado nas imagens A, D, F e K, da figura 12.

Em contrapartida, nos moluscos expostos a *H. bacteriophora* HP88, alterações significativas durante as análises histopatológicas foram denotadas, sendo estas principalmente caracterizadas quanto a fraca presença de glicogênio na massa cefalopediosa (Figura 12 B) e glândula digestiva (Figura 12 H); desorganização estrutural quanto a arquitetura do órgão (massa cefalopediosa – Figura 12 C) e acúmulo de material amorfo em ovotestes (Figura 12 I). Além disso, a massa cefalopediosa apresentou vacuolização multifocal e lise celular (Figura 12 B e C) assim como na glândula digestiva (Figura 12 G e H). Na glândula reprodutiva pode ser observado redução no número das células reprodutivas, principalmente de ovogônias (Figura 12 I) e atrofia do tecido glandular da glândula de albúmen (Figura 12 L). Não foi observado infiltrado inflamatório hemocitário.

Figura 12 - Fotomicrografia da histopatologia de *Pseudosuccinea columella* em coloração HE (C, E, G, J e L) e PAS (A, B, D, F, H, I e K) evidenciando o Grupo Controle (A, D, E, F, J e K) e Grupo Exposto (B, C, G, H, I e L).



Massa cefalopediosa com alta concentração de glicogênio (A), contrapondo a menor concentração de glicogênio (B), e desorganização das fibras musculares, vacuolização e lise celular (C); glândula digestiva demonstrando grande concentração de glicogênio (D) e correta organização celular (E), perda da organização acinar deste tecido, acompanhada da menor concentração de glicogênio e formação de estruturas císticas no grupo exposto (G e H); ovotestes demonstrando diferença na quantidade de células femininas, além de ovócitos em apoptose, acúmulo de material amorfo intracelular (F e I); glândula de albúmen fortemente

corada para glicogênio (J e K), e com atrofia do tecido glandular (L). Evidencia-se presença de glicogênio (seta azul); espermatogônias (seta preta), cisto (seta vermelha)
Fonte: O autor

No entanto, neste estudo, não foi encontrado a presença de JIs do nematoide.

As análises concentraram-se nas glândulas digestivas e albuminosa; ovotestes e massa cefalopediosa, as alterações foram indicadas comparando os moluscos expostos com os não expostos. Na glândula digestiva, dos moluscos expostos observou-se vacuolização multifocal, denotando um processo degenerativo; lise celular e fraca presença de glicogênio. Tunholi-Alves *et al.* (2013) relataram que a exposição de *A. cantonensis* também induz alterações histológicas importantes na glândula digestiva de *B. glabrata*. Segundo os autores, tal fato se justifica por ser a glândula digestiva uma região rica em reservas energética, favorecendo o desenvolvimento do nematoide, e atribuiu ao fato das larvas em desenvolvimento buscarem uma região rica de nutrientes, como é o caso da glândula e questão, além da vasta vascularização que soma a oferta de oxigênio. Informações trazidas por Faro *et al.* (2013) corroboram com os dados, onde os autores relatam que o epitélio da glândula digestiva, dos animais expostos, foi mal preservado após exposição aos miracídios de *S. mansoni*, observando-se assim atrofia parcial do tecido original, progredindo para as células germinativas no ovotestes.

Quanto a glândula albuminosa e ovotestes, observou-se redução no número das células reprodutivas, principalmente de ovogônias, além do acúmulo de material amorfo em ovotestes. Pan (1965) afirma que alterações histopatológicas no tecido gonadal do hospedeiro, afeta diretamente o sistema reprodutivo, levando a uma redução da capacidade reprodutiva. Os resultados reportados neste estudo corroboram com os achados descritos por Faro *et al.* (2013) e revelam o aparecimento de áreas claras devido à diminuição da densidade celular. Os autores reiteram que esses achados sugerem uma redução dos recursos envolvidos na reprodução, levando à interrupção da oviposição durante o período patente da exposição. Esse desfecho caracteriza o fenômeno biológico de redução da fecundidade.

Na massa cefalopediosa, observou-se fraca presença de glicogênio, vacuolização multifocal, lise celular e desorganização estrutural. Tunholi-Alves *et al.* (2013) descrevem que a redução do teor de galactogênio resulta em uma baixa taxa de eclosão, que caracteriza, também, o processo nutricional na castração parasitária ou redução da fecundidade, pois refletem na formação de ovos e na viabilidade dos

embriões, uma vez que esses polissacarídeos fazem parte do fluido peri-vitelino que é usado como fonte de nutrientes pelos embriões em desenvolvimento em seus ovos e após a eclosão.

Há relatos na literatura de outras alterações que não foram observadas neste estudo. Lima *et al.* (2017) relataram a participação de células basofílicas hemolinfáticas que compõem o processo inflamatório, resultando posteriormente na formação de granuloma. Assim também descrevem Vidal *et al.* (2021) com a visualização de infiltrado hemocitário na glândula digestiva, em decorrência ao deflagramento de um processo inflamatório, contribuindo para a perda da função do órgão em questão.

Tais estruturas inflamatórias não foram visualizadas no presente estudo, e esta ausência também foi descrita por Amaral *et al.* (2022), e algumas hipóteses podem estar relacionadas. De acordo com Ribeiro, Vignes e Breh´Elin (2003), a ausência desses hemócitos circulante e formação de granulomas em insetos é resultado da degradação dos granulócitos por citotoxinas produzidas pelo metabolismo da bactéria. Outra hipótese, seria o mecanismo de escape, como por exemplo acontece no parasitismo por *Leishmania*. A infecção por *Leishmania* é caracterizada pela habilidade do parasito em escapar da destruição extracelular e penetrar em células fagocíticas, macrófago, onde vão resistir ao seu poder antimicrobiano, persistindo mesmo na presença de resposta imune celular do hospedeiro (CUNNINGHAM, 2002). No entanto, os dados aqui obtidos não permitem elucidar qual mecanismo ocorreu no complexo nematoide/bactéria, justificando a necessidade de mais pesquisas.

5. CONCLUSÕES

Este trabalho é o primeiro relato da suscetibilidade de *Pseudosuccinea columella* à infecção por *Heterorhabditis bacteriophora* HP88. A exposição provocou consideráveis distúrbios fisiológicos, comprometendo assim os parâmetros homeostáticos do molusco, os índices reprodutivos e teciduais, bem como mortalidade expressiva. Assim, os dados histológicos, fisiológicos e reprodutivos, nos permite sugerir que a relação *P. columella/H. bacteriophora* HP88 demonstra-se experimentalmente funcional e potencial ferramenta alternativa no controle biológico deste molusco. Nessa perspectiva, o presente estudo reforça a patogenicidade de

NEPs para moluscos, proporcionando a descrição de mais uma espécie suscetível à infecção.

6. REFERÊNCIAS

- ADAMS, B. J., *et al.* Biodiversity and systematics of nematode-bacterium entomopathogens. **Biology Control**, v.37, p.32-49, 2006. [http://dx.doi.org/10.1016/S1049-9644\(06\)00126-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1049-9644(06)00126-5).
- ADEOLU, M. *et al.* Genome-based phylogeny and taxonomy of the ‘Enterobacteriales’: proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. **Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, p. 5575–5599, 2016. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001485>.
- ALEIXO, M. A. *et al.* *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. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2015v36n3p1451>
- ALMEIDA, A. M. F. *et al.* Prevalência de fasciolose no sul do espírito santo: 2017-2019. **XXV Encontro Latino Americano de Iniciação Científica**, 2021.
- ALMENARA, D. P. *et al.* Entomopathogenic nematodes: Two Sides of a symbiosis. **Revista da Biologia**, v. 6, p. 1-6, 2010. <http://dx.doi.org/10.7594/revbio.06b.01>.
- ALMENARA, D. P, *et al.* Nematoides Entomopatogênicos. **Tópicos Avançados em Entomologia Molecular**, INCTEM, v.16- p.1-40, 2012.
- ALVAREZ-MERCADO, J.M. *et al.* In vitro antihelminthic effect of fifteen tropical plant extracts on excysted flukes of *Fasciola hepatica*. **BMC Veterinary Research**. 2015. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0362-4>.
- AMARAL, L. S. *et al.* Glycemic profile of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda: Planorbidae) exposed to *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae): Potential control of schistosomiasis. **Brazilian Journal of Development**, v.7, n.1, p.1401-1411, 2021. <https://doi.org/10.34117/BJDV7N1-095>.
- AMARAL, L. S. *et al.* *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae), isolate HP88, induces reproductive and physiological alterations in *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda: Planorbidae): an alternative for biological control of schistosomiasis. **Acta Tropica**, v. 230, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106396>
- BABIC, I. *et al.* Occurrence of natural dixenic associations between the symbiont *Photorhabdus luminescens* and bacteria related to *Ochrobactrum* spp. in tropical

entomopathogenic *Heterorhabditis* spp. (Nematoda, Rhabditida). **Microbiology**, n. 146, p. 709–718, 2000. <https://doi.org/10.1099/00221287-146-3-709>.

BACKRY, A. F. Impact of some plants extracts on histological structure and proteins patterns of *Biomphalaria alexandrina* snails. **Global journal of molecular sciences**, v. 4, n.1, p. 34-41, 2009.

BARBOSA, F. S. **Tópicos em malacologia médica**. FIOCRUZ. 314 p. 1995.

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

BAYOMY, M. F; ELK, R. V.; JOOSSE, J. The effects of starvation and refeeding on egg laying and the synthetic activity of the albumen gland in *Bullins truncatus*, a snail vector of urinary schistosomiasis. **Comparative biochemistry and physiology**, v. 87, n. 3, p. 607-612, 1987. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(87\)90369-0](https://doi.org/10.1016/0300-9629(87)90369-0).

BECKER, W. Metabolic interrelationship of parasitic trematodes and molluscs, especially *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*. **Zeitschrift fur Parasitenkunde**, v. 63, p.101-111, 1980. <https://doi.org/10.1007/bf00927526>.

BECKER, W.; SCHMALE, H. The nitrogenous products of degradation – ammonia, urea and uric acid – in the hemolymph of the snail *Biomphalaria glabrata*. **Zeitschrift fur Parasitenkunde**, v.51A, p.407-411, 1975. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(75\)90388-6](https://doi.org/10.1016/0300-9629(75)90388-6).

BENNEMA, S. C. *et al.* *Fasciola hepatica* in bovines in Brazil: data availability and spatial distribution. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 1, p. 35-41, 2014. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652014000100005>.

BERNARDO, C. C. *et al.* Prevalence of liver condemnation due to bovine fasciolosis in Southern Espírito Santo: temporal distribution and economic losses. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.20, n.1, p.49-53, 2011. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612011000100010>.

BIRD, A. F; AKHURST, R. J. The nature of the intestinal vesicle in nematodes of the family Steinernematidae. **International Journal for Parasitology**, v. 13, n. 6, p. 599–606, 1983. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(83\)80032-0](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(83)80032-0).

BISHOP, S. H.; ELLIS, L. L.; BURCHAM, J. M. Aminoacid metabolismo on molluscs. In the Mollusca. Metabolic Biochemistry and Molecular Biomechanics, **Academic Press**, v.1 p. 237-243, 1983. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-751401-7.50013-2>.

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*. **International Journal Systematic Bacteriology**. v.43, n.2, p.249-255, 1993. <https://doi.org/10.1099/00207713-43-2-249>.

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.

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

BONFIM, T. C. S. *et al.* Biochemical and histopathological alterations in *Biomphalaria glabrata* due to co-infection by *Angiostrongylus cantonensis* and *Echinostoma paraensei*, **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 115, p. 80-85, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2013.10.005>.

BONFIM, T. C. S. *et al.* Evaluation of changes in the carbohydrate metabolism of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) exposed to experimental coinfection by *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda) and *Echinostoma paraensei* (Trematoda), **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 170, 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.107314>.

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

BUNDY, D. This wormy world – then and now. **Parasitology today**, v. 13, p. 407-408, 1997. <https://doi.org/10.2307/3285767>.

CANTANHEDE, S. P. D. *et al.* Plant molluscicidal activity: a prophylactic alternative. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n.2, p. 282-288, 2010.
<https://doi.org/10.1590/S0102-695X2010000200024>.

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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2019.107212>.

CHRISTENSON, R. H; FINLEY, P. R; SILVERMAN, L. M. Immunochemical assays for IgG, IgA, IgM and transferrin compared. **Clinical Biochemistry**, v. 22, n. 4, p. 271-276, 1989. [https://doi.org/10.1016/s0009-9120\(89\)80016-5](https://doi.org/10.1016/s0009-9120(89)80016-5).

CHRISTIE, J. D.; MICHELSON, E. H. Transaminase levels in the digestive gland-gonad of *Schistosoma mansoni*-infected *Biomphalaria glabrata*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.50B, n.2, p.233-236, 1975.
[https://doi.org/10.1016/0305-0491\(75\)90268-0](https://doi.org/10.1016/0305-0491(75)90268-0).

CICHE, T. A. *et al.* Dangerous liaisons: The symbiosis of entomopathogenic nematodes and bacteria. **Biological control**, v. 38, n. 1, p. 22–46, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2005.11.016>.

CONNERTY, H. V.; BRIGGS, A. R.; EATEN, E. H. Determination of blood urea nitrogen using a simple stabilizing reagent. **American Journal of Clinical Pathology**, v.25, p.1321, 1955. https://doi.org/10.1093/ajcp/25.11_ts.1321.

COOPER, L. A. *et al.* *Schistosoma mansoni*: relationship between low fecundity and reduced susceptibility to parasite infection in the snail *Biomphalaria glabrata*. **Experimental Parasitology**, v. 79, p. 21-28, 1994. <https://doi.org/10.1006/expr.1994.1055>.

COSTA, A. V. *et al.* Efeito moluscicida do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* Jowitt (Poaceae) sobre *Lymnaea columella* (Say, 1817) e *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, p. 707-712, 2015. http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/14_017.

CUNNINGHAM, A. C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 72, p. 132-141, 2002. <https://doi.org/10.1006/exmp.2002.2418>

DEL VALLE, E. E. *et al.* Efficacy of *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Nematoda: Rhabditida) applied in *Galleria Mellonella* (Lepdoptera: Pyralyidae) insect cadavers to *Conotrachelus psidii* (Coleoptera, Curculionidae) Larvae. **Biological Control Science Technology**. v.18, p. 33-41, 2008. <http://dx.doi.org/10.1080/09583150701721713>

DIAS, T. O. **Composição da malacofauna límnic da microregião de Juiz de Fora, Zona da Mata**, MG. 2013, 75 p. Dissertação (mestrado acadêmico) Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Comportamento animal, Juiz de Fora, 2013

DOLINSKI, C. Uso de nematoides entomopatogênicos para o controle de pragas. p. 261-289. In: VENZON, M.; DE PAULA JR. T.J.; PALLINI, A. **Tecnologias Alternativas para o Controle Alternativo de Pragas e Doenças**, 1. Ed. Vicosa: EPAMIG, p. 377, 2006a

DOLINSKI, C. Nematoides como agentes do controle biológico de insetos. In: **Fundamentos para regulação de semioquímicos, inimigos naturais e agentes microbiológicos de controle de pragas**. Brasília: EMBRAPA, p. 85, 2006b.

DUARTE, G. F. *et al.* New insights into the amphibious life of *Biomphalaria glabrata* and susceptibility of its egg masses to fungal infection. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 125, p. 31-36, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.12.013>.

DUTRA, L. H. *et al.* Mapping risk of bovine fasciolosis in the south of Brazil using Geographic Information Systems. **Veterinary Parasitology**, v.169, p.76-81, 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.12.015>.

ECHEVARRIA, F. A. M. Mesa redonda sobre fasciolose bovina. **Hora Veterinária**, n. 1, p. 27-31, 1995.

ELEFThERIANOS, I. *et al.* Dissecting the immune response to the entomopathogen *Photorhabdus*. **Trends in Microbiology**, v. 18, p. 552-560, 2010.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2010.09.006>.

FARO, M. J. *et al.* Biological, biochemical and histopathological features related to parasitic castration of *Biomphalaria glabrata* infected by *Schistosoma mansoni*, **Experimental Parasitology**, v. 134, p. 228-234, 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.03.020>.

FREITAS, D. F. *et al.* Bioclimatic distribution and prevalence maps for *Fasciola hepatica* in Espírito Santo State, Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 20, p. 1- 11, 2014.

GERAERTS, W. P. M. Neurohormonal control of growth and carbohydrate metabolism by the light green cells in *Lymnaea stagnalis*. **General and Comparative Endocrinology**, n. 86, p. 433- 444, 1992.
[https://doi.org/10.1016/0016-6480\(92\)90068-U](https://doi.org/10.1016/0016-6480(92)90068-U).

GIL, G. H.; CHOO, H. Y.; GAUGLER, R. Enhancement of entomopathogenic nematode production in -in-vitro liquid culture of *Heterorhabditis bacteriophora* by fed-batch culture with glucose supplementation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, p. 751-755, 2002. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-002-0956-1>.

GIOKAS, S.; PAFILIS, P.; VALAKOS, E. Ecological and physiological adaptations of the land snail *Albinaria caerulea* (Pulmonata: Clausiliidae). **Journal of Mollusk Students**, v.71, n.1, p.15-23, 2005.

GOMES, D. L. **Interrelação entre *Fasciola hepatica* L., 1758 e *Lymnaea columella* Say, 1817: Susceptibilidade e Patogenia**. Tese de Doutorado. PhD Thesis, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguai, 1985.

GOMES, F. F. *et al.* Estabelecimento de foco de fasciolose hepática em propriedades do município de Campos dos Goytacazes no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 11, n. 2, p. 53 - 56, 2002.

GOUDSMIT, E. M. Carbohydrate and carbohydrate metabolism in molluscs, In: Chemical Zoology Mollusca, **Academic Press**, v. 7, n. 567, p. 219- 243 1972.

GRESS, F. M.; CHENG, T. C. Alterations in total serum protein fractions in *Biomphalaria glabrata* parasitized by *Schistosoma mansoni*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.22, p.382-390, 1973. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(73\)90169-9](https://doi.org/10.1016/0022-2011(73)90169-9).

HUMASON, G.L. Animal Tissue Techniques, fourth ed. W.H. Freeman, San Francisco, USA, 1979.

HUSSA, E. A.; GOODRICH-BLAIR, H. It takes a village: Ecological and impacts of multipartite mutualism. **Annual Review of Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 161-178, 2013. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155723>.

JEFFKE, T. *et al.* Growth of *Photorhabdus luminescens* in batch and glucose fed-batch culture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, p. 326–330, 2000. <https://doi.org/10.1007/s002530000399>.

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. <http://dx.doi.org/10.12983/ijres-2013-p224-230>.

KAYA, H. K. Molluscicidal nematodes for biological control of pest slugs. **Slosson Report**, 2000.

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

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

LAMBSHEAD, P. J. D. Recent developments in marine benthic biodiversity research. **Oceanis**, n. 19, p. 5-24, 1993.

LAWRENCE, J. L.; HOY, C. W.; GREWAL, P. S. Spatial and temporal distribution of endemic entomopathogenic nematodes in a heterogeneous vegetable production landscape. **Biological Control**, v. 37, n. 3, p. 247-255, 2006.

LEITE, L.G. *et al.* Patogenicidade de *Steinernema* spp. e *Heterorhabditis* sp. (NEMATODA: RHABDITIDA) a ninfas da cigarrinha da raiz da cana-de-acucar (*Mahanava fimbriolata*). **Revista de Agricultura**, v. 78, p.139-148, 2003. <http://dx.doi.org/10.37856/bja.v78i1.1384>

LEWIS, E. E, *et al.* Behavioral ecology of entomopathogenic nematodes. **Biological Control**, v. 38, p. 66–79, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2005.11.007>

LIMA, M. G. *et al.* Effects of experimental *Angiostrongylus cantonensis* infection on the reproductive biology of *Biomphalaria straminea* and *Biomphalaria tenagophila*, **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 149, p. 106-113, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2017.08.006>.

LINDEGREN, J. E; VALERO, K. A; MACKEY, B. E. Simple in vivo production and storage methods for *Steinernema carpocapsae* infective juveniles. **Journal of Nematology**, v. 25, n. 2, p. 193-197, 1993.

LOCKYER, A. E, *et al.* Trematodes and snails: An intimate association. **Canadian journal of zoology**, v. 82, p.251-269, 2004. <http://dx.doi.org/10.1139/z03-215>.

- LORDELLO, L. G. E. Endotoquia matricida em Rhabditis sp. (Nematoda, Rhabditidae). **University of São Paulo “Luiz de Queiroz”**, n, 8, p. 111-114, 1951.
- MACHADO, R. A. R. *et al.* Whole-genome-based revisit of *Photorhabdus phylogeny*: proposal for the elevation of most *Photorhabdus* subspecies to the species level and description of one novel species *Photorhabdus bodei* sp. nov., and one novel subspecies *Photorhabdus laumondii* subsp. clarkei subsp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 68, p. 2664–2681, 2018. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002820>.
- MANOHAR, L.; RAO, P. V.; SWAMI, K. S. Variations in aminotransferase activity and total free amino acid level in the body fluid of the snail *Lymnaea luteola* during different larval trematode infection. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.19, p.36-41, 1972. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(72\)90186-3](https://doi.org/10.1016/0022-2011(72)90186-3).
- MARQUES, S. M. T., SCROFERNEKER, M. L. *Fasciola hepatica* infection in cattle and buffaloes in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Parasitologia Latino-americana**, v.58, n.3-4, p.169-172, 2003.
- MARTINS. F. G. ***Bulimulus tenuissimus* (mollusca) como novo hospedeiro experimental para *Angiostrongylus cantonensis* (nematoda), um estudo morfológico e fisiológico da interação parasito-hospedeiro.** Tese (Doutorado em Ciências) Programa de Pós-Graduação Ciências Veterinárias da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2018.
- MARTINS, I. V. F. *et al.* Application of a geographical information system approach for risk analysis of fascioliasis in southern Espírito Santo state, Brazil. **Geospatial Health**, v. 6, n. 3, p. 87-93, 2012. <https://doi.org/10.4081/gh.2012.126>.
- MARTINS, I. V. F. *et al.* Distribution of bovine fasciolosis and associated factors in south Espírito Santo, Brazil: an update. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 1, p.23-29, 2014.
- MAS-COMA, S.; VALERO, M. A.; BARGUES, M. D. *Fasciola*, Lymnaeids and Human Fascioliasis, with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control. **Advances in Parasitology**, v. 69, p. 44-68, 2009. [https://doi.org/10.1016/s0065-308x\(09\)69002-3](https://doi.org/10.1016/s0065-308x(09)69002-3).
- MAZERI, S. *et al.* Evaluation of the performance of five diagnostic tests for *Fasciola hepatica* infection in naturally infected cattle using a bayesian no gold standard approach. **PLoS ONE**, v.11, n. 8, p. 1-22, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161621>.
- MEDEIROS, C. *et al.* Spatial distribution of Lymnaeidae (Mollusca, Basommatophora), intermediate host of *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 (Trematoda, Digenea) in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, p. 235-252, 2014. <https://doi.org/10.1590/s0036-46652014000300010>.
- MELLO-SILVA, C. C. *et al.* 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. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762010000400024>.

MEZO M. *et al.* Association between anti-*F. hepatica* antibody levels in milk and production losses in dairy cows. **Veterinary Parasitology**, v. 180, p. 237–242, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.03.009>.

MINCHELLA, D. J. Host life-history variation in response to parasitism. **Parasitology**, v. 90, n. 01, p. 205-216, 1985. <https://doi.org/10.1017/S0031182000049143>.

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. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2017.12.004>.

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**. n. 106, p. 821-826, 2010. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1720-6>.

MONTEIRO, C. M. O. *et al.* *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) HP88 for biological control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae): The effect of different exposure times of engorged females to the nematodes. **Veterinary Parasitology**, v. 185, n. 2, p. 364-367, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.10.007>.

MONTEIRO, C. M. O. **Seleção de nematoides entomopatogênicos em formulação inseto cadáver para controle de *Rhipicephalus microplus* (acari: ixodidae)**. In:___ Controle de *Rhipicephalus microplus* (acari: ixodidae) com nematoides entomopatogênicos: aplicação em formulação inseto cadáver e compatibilidade com outros agentes de controle. 2014. Tese (Doutor em ciências) - Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Seropédica, 2014.

MONTEIRO, C. M. O.; PRATA, M. C. A. **Controle biológico do carrapato dos bovinos *Rhipicephalus microplus* com a utilização de nematoides entomopatogênicos: conquistas e desafios**. In: Controle do carrapato do boi. Controle no pasto, 2013.

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

MOTA, M. A.; CAMPOS, A. K.; ARAÚJO, J. V. Biological control of helminth parasites of animals: current stage and future outlook. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 23, p. 93-100, 2003. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2003000300001>.

NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. 13. ed. São Paulo: Atheneu, 2016.

NOGUEZ, J. H., *et al.* A novel ascarioside controls the parasitic life cycle of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora*. **ACS Chemical Biology**, v. 7, n. 6, p. 961-966, 2012. <https://dx.doi.org/10.1021%2Fcb300056g>.

OLIVEIRA, S. M.; SPÓSITO-FILHA, E. Fasciolose hepática. **Biológico**; v.71, n. 1, p. 5-7, 2009.

OGIER, J. C., *et al.* Entomopathogenic nematode-associated microbiota: from monoxenic paradigm to pathobiome. **Microbiome**, v. 8, n. 1, p. 25, 2020. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00800-5>.

PAN, C. T. Studies on the host-parasite relationship between *Schistosoma mansoni* and the snail *Australorbis glabratus*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, n. 14, p. 931-976, 1965. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1965.14.931>.

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.

PASCHOAL, S. V.; AMATO, S. B. *Eurytrema coelomaticum* (Giard et Billet) (Digenea: Dicrocoeliidae) em *Bradybaena similaris* (Férussac) (Gastropoda: Xanthonychidae): alterações nos depósitos de cálcio e na função reprodutiva do primeiro hospedeiro intermediário. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.13, p.411–418, 1996. <https://doi.org/10.1590/S0101-81751996000200011>.

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.; AMATO, S. B. *Eurytrema coelomaticum* (Digenea, Dicrocoeliidae): the effect of infection on carbohydrate contents of its intermediate snail host, *Bradybaena similaris* (Gastropoda, Xanthonychidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.89, p.407–410, 1994. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761994000300020>

PINHEIRO, J.; AMATO, S. B. *Eurytrema coelomaticum*: influence of the infection on the reproduction and nucleic acids contents in the albumen gland and ovotestis of *Bradybaena similaris*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.90, p.635–638, 1995. <https://doi.org/10.1590/s0074-02761995000500019>.

PINHEIRO, J. Influence of Starvation on the Glycogen and Galactogen Contents in the Snail *Bradybaena Similaris* (Férussac, 1821) (Mollusca, Gastropoda). **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v.39, p.349-357, 1996. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-81752000000400003>.

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., GOMES, E. M., CHAGAS, G. M. Aminotranferases activity in the hemolymph of *Bradybaena similaris* under starvation. **Memórias Instituto Oswaldo**

Cruz, v. 96, p. 1161–1164, 2001. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762001000800022>.

PINHEIRO, J.; MALDONADO J. R, A.; LANFREDI, R. M. Physiological changes in *Lymnaea columella* (Say, 1817) (Mollusca, Gastropoda) in response to *Echinostoma paraensei* Lie and Basch, 1967 (Trematoda: Echinostomatidae) infection. **Parasitology Research**, v.106, p.55–59, 2009. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1630-7>.

PINHEIRO, L. *et al.* Phytochemical study and evaluation of the molluscicidal activity of *Kielmeyera variabilis* Mart. (Clusiaceae). **Química Nova**, v. 26, n. 2, p. 157-160, 2003. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000200002>.

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.

POINTIER *et al.* Distribution of Lymnaeidae (Mollusca: Pulmonata), intermediate snail hosts of *Fasciola hepatica* in Venezuela. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 5, p. 790-796, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000500022>.

RIBEIRO, C.; VIGNES, M.; BREH'ELIN, M. *Xenorhabdus nematophila* (Enterobacteriaceae) secretes a cation-selective calcium-independent porin which causes vacuolation of the rough endoplasmic reticulum and cell lysis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 3030–3039, 2003. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210353200>

ROSSI, C. **As proteínas do vitelo do nematoide entomopatogênicos *Heterorhabditis baujardi* LPP7**, Dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro) Programa de Pós-Graduação do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

SAEEDIZADEH, A.; NIASTI, F. Response of grey slug to entomopathogenic nematodes. **Bragantia**, v. 79, p. 447–56, 2020. <https://doi.org/10.1590/1678-4499.20200107>.

SCHWEIZER G, *et al.* Estimating the financial losses due to bovine fasciolosis in Switzerland. **The Veterinary record**, v. 157, p. 188–193, 2005. <https://doi.org/10.1136/vr.157.7.188>.

SCHURKMAN, J., DILLMAN, A. R. Entomopathogenic nematode-gastropod interactions. **Journal of Nematology**, v. 53, p. 61, 2021. <https://doi.org/10.21307/jofnem-2021-061>.

SILVA, I. C. *et al.* Fasciolose. I – incidência e importância na bovino e ovinocultura do RS. **Lavoura Arrozeira**, v. 33, n. 323, p. 34-42, 1980.

SINGH, S. K. *et al.* Molluscicides from some common medicinal plants of eastern Uttar Pradesh, India. **Journal of Applied Toxicology**, v. 30, n.1, p. 1-7, 2010. <https://doi.org/10.1002/jat.1498>.

SOBRINHO, A. C. M. *et al.* Infection and reinfection of *Stomoxys calcitrans* larvae (Diptera: Muscidae) by entomopathogenic nematodes in different times of exposure. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 30, n. 3, 2021.

SOUZA, S. P. *et al.* Principais causas de condenação de fígado bovino em estabelecimento sob Serviço de Inspeção Federal na Zona da Mata mineira. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, n. 4, p. 1054-1061, 2017. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-9300>.

STOK, S. P. CAMPBELL, J. F.; NADLER, S. A. Phylogeny of *Steinernema* travassos, 1927 (cephalobina: Sterinernematidae) inferred from ribosomal DNA sequences and morphological characters, **Journal of Parasitology**, v. 87, n. 4, p. 877-889, 2001. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2001\)087\[0877:postcs\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2001)087[0877:postcs]2.0.co;2)

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

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

TEIXEIRA J. L. R, QUEVEDO, L. S; QUEVEDO, P. S. Economic losses due to fasciolosis in cattle carcasses submitted to the municipal inspection service in Pelotas, RS, Brazil. **Ciência Animal**, v.30, n.1, p.11-22, 2020.

THOMAZ, T. F. P. *et al.* Hepatic fascyle in south of the holy spirit: diagnosis of Prevalence and economic losses. **Revista Dimensão Acadêmica**, v.4, n.1. 2019.

THOMPSON, S. N.; MEJIA-SCALES, V.; BORCHARDT, D. B. Physiologic studies of snail-schistosome interactions and potential for improvement of in vitro culture of schistosomes. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, v.27, p.497-504, 1991. <https://doi.org/10.1007/bf02631151>.

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*. **Parasitenkunde Parasitology Research**, v. 72, p. 417-421, 1986. <https://doi.org/10.1007/BF00928752>.

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

TIETZ, N. W. **Fundamentos de química clínica e diagnóstico molecular** / [editoria] BURTIS, C. A.; BRUNS, D. E.; Tradução: RODRIGUES, F. S. M. - 7. ed. - Rio de Janeiro : Elsevier, 2016.

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, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2011.03.009>

TUNHOLI-ALVES V. M. *et al.* Effects of infection by larvae of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda, Metastrongylidae) on the metabolism of the experimental intermediate host *Biomphalaria glabrata*. **Experimental Parasitology**, v. 131, p. 143–147, 2012.

TUNHOLI-ALVES, V. M. Effects of infection by larvae of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda, Metastrongylidae) on the lipid metabolism of the experimental intermediate host *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Gastropoda). **Experimental Parasitology**, v. 131, p. 143-147, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3308-4>.

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. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2013.09.004>

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. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.10.001>

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, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2010.09.006>

TUNHOLI, V. M. *et al.* Aerobic to anaerobic transition in *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) infected with different miracidial doses of *Echinostoma paraensei* (Lie and Basch, 1967) by high-performance liquid chromatography, **Experimental Parasitology**, v. 133, n. 4, p. 403-410, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.01.012>

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. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2014.02.005>

TUNHOLI, V. M, *et al.* Evaluation of the mitochondrial system in the gonad-digestive gland complex of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca, Gastropoda) after infection by *Echinostoma paraensei* (Trematoda, Echinostomatidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, n. 136, p. 136–141, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.04.003>.

TUNHOLI, V. M., *et al.* Molluscicidal potential of *Heterorhabditis baujardi* (Rhabditida: Heterorhabditidae), strain LPP7, on *Lymnaea columella* (Gastropoda: Pulmonata): An alternative for biological control of fasciolosis. **Acta Tropica** v.173, p. 23-29, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.05.024>.

VASCONCELOS, V. O. *et al.* *Steinernema glaseri* Santa Rosa strain (Rhabditida: Steinernematidae) and *Heterorhabditis bacteriophora* CCA strain (Rhabditida: Heterorhabditidae) as biological control agentes os *Boophilus microplus* (acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 94, n. 3, p. 201-206, 2004. <https://doi.org/10.1007/s00436-004-1178-5>.

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, 2018.

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

VIDAL, M. L. B. *et al.* Physiological alterations in *Pseudosuccinea columella* (Mollusca: Gastropoda) after infection by *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Rhabditida: Heterorhabditidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 186, n. 107676, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2021.107676>.

VIEIRA, N. P. *et al.* Condenação de fígados bovinos na região sul do estado do Espírito Santo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte , v. 63, n. 6, p. 1605-1608, 2011.

WAKELIN, D. Genetic control of susceptibility and resistance to parasitic infection. **Advances in Parasitology**, n.16, p. 219-308, 1978. [https://doi.org/10.1016/s0065-308x\(08\)60575-8](https://doi.org/10.1016/s0065-308x(08)60575-8).

WATERFIELD, N. R. *et al.* Potentiation and cellular phenotypes of the insecticidal toxin complexes of *Photorhabdus* bacteria. **Cellular Microbiology**. n. 7, p. 373-382, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00467.x>.

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**, v. 16, p. 40-49, 1946.

WILSON, M. J.; GLEN, D. M.; GEORGE, S. K. The rhabditid nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita* as a potential biological control agent for slugs. **Biocontrol Science and Technology**, v. 3, n. 4, p. 503-511, 1993. <https://doi.org/10.1080/09583159309355306>.

WILSON, M. J. *et al.* Biocontrol of slugs in protected lettuce using the rhabditid nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 5, n. 2, p. 233-242, 1995. <https://doi.org/10.1080/09583159550039954>.

WHO. **World Health Organization**. Fascioliasis: infection with the “neglected” neglected worms. 2020. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/q-a-on-fascioliasis> Acesso em: 07 fev 2022.

WOOD, W. B. The Nematode *Caenorhabditis elegans*. Cold Spring Harbor, 678pp. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, New York, 1988.

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. <http://doi.org/10.1645/13-260.1>.