

UFRRJ

INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

DISSERTAÇÃO

**Efeito do parasitismo por digenea na atividade locomotora
de peixes e moluscos hospedeiros.**

Everton Gustavo Nunes dos Santos

2013



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

**EFEITO DO PARASITISMO POR DIGENEA NA ATIVIDADE
LOCOMOTORA DE PEIXES E MOLUSCOS HOSPEDEIROS.**

EVERTON GUSTAVO NUNES DOS SANTOS

Sob a Orientação da Professora

Cláudia Portes Santos Silva

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

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2013

636.089696

S237e

T

Santos, Everton Gustavo Nunes dos, 1983-
Efeito do parasitismo por Digenea na
atividade locomotora de peixes e moluscos
hospedeiros / Everton Gustavo Nunes dos
Santos - 2013.

48 f. : il.

Orientador: Cláudia Portes Santos Silva.

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

Bibliografia: f. 30-34.

1. Parasitologia veterinária - Teses. 2.
Peixe - Parasito - Comportamento - Morfologia
- Teses. 3. Molusco - Parasito -
Comportamento - Morfologia - Teses. 4.
Organismos aquáticos - Parasito - Teses. 5.
Trematódeo - Teses. I. Silva, Cláudia Portes
Santos, 1959-. II. Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias. III. Título.

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

EVERTON GUSTAVO NUNES DOS SANTOS

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


DISSERTAÇÃO APROVADA EM 21 / 02 / 2013




Dr^a Cláudia Portes Santos Silva IOC/UFRRJ
(Orientadora)



Dr José Luis Fernando Luque Alejos UFRRJ
(Banca examinadora)



Dr Luiz Eduardo Roland Tavares UFMS
(Banca examinadora)



Dr^a Clélia Christina Corrêa de Mello Silva – IOC/FIOCRUZ
(Banca examinadora)

EPÍGRAFE

“Assim que você confiar em si mesmo,
você saberá como viver.”

Johann Goethe

DEDICATÓRIA

A minha filha Ana Clara, meus pais Jorge Carlos e Sandra Nunes e irmãos que são o verdadeiro sentido para meus esforços e me guiam para realização dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço à minha orientadora Dr^a. Cláudia Portes Santos Silva por todo o ensinamento, amizade e oportunidade dada tornando possível a realização dos meus sonhos.

A todos os amigos do Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental em especial Luiz Felipe, Juliana Novo, Daniele Miranda, Ronaldo Augusto, Deyse Paganotti, Marly Melo, Helena Lucia pela cooperação nas tarefas do laboratório, incentivo e alegrias proporcionadas no trabalho.

A todos os professores, funcionários, e amigos do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ, principalmente ao professor Dr. José Luis Fernando Luque Alejos pelo apoio oferecido durante todo curso de mestrado.

Agradeço também a todos os amigos e familiares que de alguma forma contribuíram na minha carreira.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro, na forma de bolsa de mestrado e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (BIOTA FAPERJ), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) nos programas PROCAD-NF e PARASITOLOGIA BÁSICA CNPq pelo apoio financeiro ao projeto.

RESUMO

SANTOS, Everton Gustavo Nunes dos. **Efeito do parasitismo por Digenea na atividade locomotora de peixes e moluscos hospedeiros.** 2013. 53p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2013.

Os parasitos são capazes de alterar uma variedade de características de seus hospedeiros como comportamento, morfologia e estruturas sociais. Processos de alterações comportamentais são comumente encontrados em parasitos cujo ciclo de vida é complexo e com transmissão através da teia trófica. Organismos aquáticos são comumente utilizados em ensaios comportamentais, e peixes e moluscos são considerados bons modelos nesta linha de pesquisa. No Capítulo I, é apresentado um trabalho no qual se avalia a influência da intensidade e período de desenvolvimento de *Ascocotyle (Phagicola) pindoramensis* na atividade locomotora de *Poecilia vivipara* criados em laboratório. Similarmente, no Capítulo II, um estudo comparativo foi realizado com o objetivo de avaliar a influência do parasitismo na atividade locomotora de *Melanooides tuberculatus* não infectados e naturalmente infectados por *Centrocestus formosanus*. A atividade locomotora de peixes e moluscos foi monitorada através de um sistema de biomonitoramento por análise de imagem, Videomex-V®, conectado à uma câmera de vídeo capaz de quantificar a distância percorrida, tempo em movimento ou em repouso, assim como a velocidade dos organismos. As Equações de Estimção Generalizadas (EEG) capazes de analisar dados de medidas repetidas demonstraram que embora os moluscos infectados por *C. formosanus* tenham apresentado dimensões maiores que os não infectados, o comprimento de *M. tuberculatus* e *P. vivipara* não foi um fator preponderante para alterar a atividade locomotora dos hospedeiros intermediários. Hospedeiros infectados apresentaram um padrão de atividade locomotora irregular e reduzido em comparação com os não infectados. Além disso, *P. vivipara* não alterou sua atividade locomotora decorridos 7 dias pós-infecção (dpi), mas as alterações tornaram-se evidentes 14 dias pós-infecção, apresentando um aumento no tempo de repouso. Foi experimentalmente demonstrado que em *P. vivipara* uma maior intensidade de parasitos diminuiu a atividade locomotora do hospedeiro. Os parasitos estudados são capazes de alterar o comportamento locomotor de *P. vivipara* e *M. tuberculatus*. É possível supor que a diminuição da atividade locomotora dos hospedeiros possa interferir em diferentes aspectos em um contexto ecológico em seus ambientes naturais.

Palavras-chave: alteração morfológica, alteração comportamental, organismos aquáticos.

ABSTRACT

SANTOS, Everton Gustavo Nunes dos. **Effects of parasitism by Digenea in locomotory activity of fishes and molluscs hosts.** 2013. 53p. Dissertation (Master in Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2013.

Parasites are able to alter various characteristics of the hosts, among them behavior, morphology and social structures. Process of behavioral changes are commonly found in parasites that have complex life's cycle, which transmission occur through of the trophic web. Aquatic organisms are commonly used in behavioral assays and fish and molluscs are considered as good models in this surveys. In Chapter I, we showed a survey which assess the influence of the intensity and period development of *Ascocotyle (Phagicola) pindoramensis* on locomotory activity of *Poecilia vivipara* born in laboratory. Similarly, in Chapter II, a comparative study was performed with objective of assess the influence of the parasitism on locomotory activity of *Melanoides tuberculatus* uninfected and naturally infected by *Centrocestus formosanus*. The locomotory activity of fishes and molluscs were monitored through image analysis biomonitoring system, Videomex-V®, linked to with a video camera able to record and quantify the distance travelled, moving or resting time and speed of the organisms. The Generalized Estimating Equations (GEE) able to analyse data with repeated measures showed that although infected molluscs by *C. formosanus* had showed higher length shell than uninfected ones, both the length of *M. tuberculatus* as *P. vivipara* do not was important factor to alter the locomotory activity of the intermediate hosts. Infected hosts showed a pattern of locomotory activity irregular and reduced when compare to uninfected ones. Furthermore, *P. vivipara* do not alters locomotory activity at 7 days post-infection (dpi), but the alterations become evident at 14 dpi, showing an increase on the resting time. It was experimentally showed that in *P. vivipara* higher parasites intensity decreased the locomotory activity of the host. The parasites studied are able to alter the locomotor behavior of *P. vivipara* and *M. tuberculatus*. It is surmised that the decrease of locomotory activity of the hosts can interfere different aspects in an ecological context in the natural environment.

Key words: morphological changes, behavioral changes, aquatic organism.

LISTAS DE ABREVIACOES E SÍMBOLOS

Dpi	dias pós infecção
EEG	equações de estimação generalizada
SBAI	sistema de biomonitoramento por análise de imagem
MLG	modelo linear generalizado
CIQ	critério de informação de quase-verissimilhana

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros comportamentais obtido por *Poecilia vivipara* a cada intervalo de monitoramento dos três períodos do experimento..... 16

CAPÍTULO II

Tabela 1. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros comportamentais obtido por *Melanoides tuberculatus* não infectados e infectados naturalmente por *Centrocestus formosanus* a cada intervalo de monitoramento 27

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1. Lagoa Rodrigo de Freitas. TARABINI (2013).....	1
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Acanthocollaritrema umbilicatum</i> Travassos, Freitas e Bührnheim, 1965	2
Figura 3. <i>Poecilia vivipara</i> Block e Schneider 1801	5
Figura 4. Ciclo de vida de <i>Ascocotyle (Phagicola) pindoramensis</i> (Travassos, 1928)	6
Figura 5. <i>Melanoides tuberculatus</i> Müller, 1774	7
Figura 6. Ciclo de vida de <i>Centrocestus formosanus</i> (Nishigori, 1924)	7

CAPÍTULO I

Figura 1. Sistema de Biomonitoramento por Análise de Imagem. Desenho esquemático do sistema de biomonitoramento por análise de imagem: 1 = microcomputador com software armazenador de dados em tempo real e gerador de planilha Excel; 2 = monitor de vídeo; 3 = analisador de imagens em tempo real Videomex-V [®] ; 4 = cabine de registro em acrílico; 5 = câmera de vídeo; 6 = aquário de acrílico; 7 = câmara de acrílico de exposição subdividida em oito boxes de contenção; 8 = aeradores; 9 = funil de vidro com tubo flexível de borracha de silicone; 10 = saídas para escoamento dos compartimentos.....	14
Figura 2. Gráfico comparativo dos parâmetros comportamentais de <i>Poecilia vivipara</i> antes das infecções (não infectados), 7 dpi e 14 dpi por 40 cercárias de <i>Ascocotyle (Phagicola) pindoramensis</i> . A. Distância Percorrida (mm), B. Tempo Ambulatorial (seg), C. Tempo Estereotipado (seg), D. Tempo em Repouso (seg) e E. Velocidade Média (mm/s). Barras mostram a média \pm 95% intervalos de confiança	17
Figura 3. Gráfico de correlação dos parâmetros comportamentais de <i>Poecilia vivipara</i> e a intensidade de metacercárias de <i>Ascocotyle (Phagicola) pindoramensis</i> recuperadas das brânquias. A. Distância Percorrida (mm), B. Tempo Ambulatorial (seg), C. Tempo Estereotipado (seg), D. Tempo em Repouso (seg) e E. Velocidade Média (mm/s). Barras mostram a média \pm 95% intervalos de confiança	18
Figura 4. Gráfico de correlação dos parâmetros comportamentais de <i>Poecilia vivipara</i> e a intensidade de metacercárias de <i>Ascocotyle (Phagicola) pindoramensis</i> recuperadas do mesentério. A. Distância Percorrida (mm), B. Tempo Ambulatorial (seg), C. Tempo Estereotipado (seg), D. Tempo em Repouso (seg) e E. Velocidade Média (mm/s). Barras mostram a média \pm 95% intervalos de confiança	19
Figura 5. Gráfico de correlação dos parâmetros comportamentais de <i>Poecilia vivipara</i> e a intensidade de metacercárias de <i>Ascocotyle (Phagicola) pindoramensis</i> recuperadas das brânquias e mesentério. A. Distância Percorrida (mm), B. Tempo Ambulatorial (seg), C. Tempo Estereotipado (seg), D. Tempo em Repouso (seg) e E. Velocidade Média (mm/s). Barras mostram a média \pm 95% intervalos de confiança	20

CAPÍTULO II

Figura 1. Gráfico comparativo dos intervalos do período de monitoramento do (a) Tempo Estereotipado (segundos) e (b) Tempo em Repouso (segundos) de <i>Melanoides tuberculatus</i> não infectados e infectados por <i>Centrocestus formosanus</i>	28
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1 Ambientes lagunares e estuarinos	1
1.2 Trematódeos de peixes da lagoa Rodrigo de Freitas	1
1.3 A influência do parasitismo sobre os hospedeiros.....	3
1.4 Modelos de estudo.....	5
1.4.1 <i>Poecilia vivipara</i> Bloch e Schneider, 1801	5
1.4.2 <i>Ascocotyle (Phagicola) pindoramensis</i> (Travassos, 1928).....	5
1.4.3 <i>Melanoides tuberculatus</i> (Müller, 1774)	6
1.4.4 <i>Centrocestus formosanus</i> (Nishigori, 1924 (Heterophyidae)).....	7
CAPÍTULO I – ALTERAÇÃO DO COMPORTAMENTO NATATÓRIO DE PEIXES HOSPEDEIROS INDUZIDA PELO DESENVOLVIMENTO DO PARASITO	9
RESUMO	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO	12
2. MATERIAL E MÉTODOS	12
2.1 Nota ética	12
2.2 Animais	13
2.3 Sistema de biomonitoramento por análise de imagem	13
2.4 Análises estatísticas	14
3. RESULTADOS	14
4. DISCUSSÃO	21
5. CONCLUSÃO	21
CAPÍTULO II – O QUE FAZ O TREMATODA <i>CENTROCESTUS FORMOSANUS</i> (HETEROPHYIDAE) AFETAR A ATIVIDADE LOCOMOTORA DE <i>MELANOIDES TUBERCULATUS</i> (THIARIDAE)?	22
RESUMO	23
ABSTRACT	24
1. INTRODUÇÃO	25
2. MATERIAL E MÉTODOS	25
2.1 Nota ética	25
2.2 Coleta e análise de moluscos.....	25
2.3 Sistema de biomonitoramento por análise de imagem	26
2.4 Análises estatísticas	26
3. RESULTADOS	27
4. DISCUSSÃO	28
5. CONCLUSÃO	29
6. CONCLUSÕES GERAIS	28
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS	30
ANEXOS	35

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Ambientes lagunares e estuarinos

Os ambientes lagunares e estuarinos são caracterizados como corpos d'água semifechados, ligando-se a ecossistemas marinhos de maneira permanente ou parcial, com temperatura, teor de salinidade e volume de água variável. Podem apresentar uma turbidez elevada e topografias caracteristicamente irregulares. Esses ambientes são utilizados por numerosas espécies de peixes, geralmente, os organismos mais abundantes em biomassa (DAY; YÁÑEZ-ARACIBIA, 1982, YÁÑEZ-ARACIBIA et al., 1994, ANDREATA, 2012).

O ecossistema da lagoa Rodrigo de Freitas, localizada na zona sul do Rio de Janeiro, Brasil (**Figura 1**), apresenta como característica um gradiente de salinidade bem inferior ao das águas do mar. Inúmeras espécies que habitam este local são eurihalinas, suportando normalmente as mudanças de salinidade, através do controle do seu potencial osmótico. Por outro lado, o caráter estenohalino de algumas espécies faz com que elas prefiram habitar na desembocadura de rios e canais onde a água apresenta salinidade mais baixa. Das espécies de peixes dessa lagoa que são a princípio de origem dulcícola, destacam-se, pela sua representatividade, *Poecilia vivipara* Bloch e Schneider, 1801, *Poecilia reticulata* Peters, 1859, *Phalloptychus januarius* (Hensel, 1868) e *Xiphophorus helleri* Heckel, 1848 (Poeciliidae); *Jenynsia multidentata* (Jenyns, 1842) (Anablepidae); *Geophagus brasiliensis* (Quoy e Gaimard, 1824) e *Tilapia rendalli* (Boulenger, 1897) (Cichlidae) (ANDREATA, 2012).



Figura 1. Lagoa Rodrigo de Freitas. TARABINI (2013)

Estes ambientes aquáticos oferecem condições ideais para o desenvolvimento e manutenção do ciclo de vida de parasitos, principalmente porque segundo Barber e Poulin (2002), a água facilita a dispersão dos ovos e estádios larvares. Além disso, as teias tróficas que incluem parasitos nestes ambientes são relativamente bem definidas, possibilitando o surgimento de ciclos de vida mais complexos.

1.2 Trematódeos de peixes da lagoa Rodrigo de Freitas

O estudo dos trematódeos de peixes da lagoa tem adicionado informações significativas sobre a morfologia, ultraestrutura e ciclo de vida de diferentes espécies de Heterophyidae Leiper, 1909 e Cryptogonimidae Ward, 1917, (SIMÕES et al., 2008, 2009a, 2009b, SIMÕES et al., 2010).

O ciclo de vida de *Acanthocolaritrema umbilicatum* Travassos, Freitas e Bührnheim, 1965, por exemplo, foi parcialmente reproduzido em nosso laboratório, no qual foi utilizado o molusco *Heleobia australis* (d'Orbigny, 1835) como primeiro hospedeiro intermediário, o peixe barrigudinho *P. vivipara* como segundo hospedeiro intermediário e o robalo *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1792) como hospedeiro definitivo (SIMÕES et al., 2008) (**Figura 2**). Neste estudo, os peixes *C. undecimalis* foram coletados na lagoa Rodrigo de Freitas e transportados ao laboratório onde foram necrópsiados e adultos de *A. umbilicatum* contendo ovos retirados. Em seguida, os moluscos criados em laboratório foram individualmente infectados colocando-se os ovos deste parasito em seus aquários. Cerca de 42 dias pós-infecção os moluscos iniciaram a eliminação de cercárias que por sua vez foram utilizadas nos experimentos.

Os ciclos de vida de *Ascocotyle (Phagicola) pindoramensis* (Travassos, 1928), *Ascocotyle (Phagicola) diminuta* (Stunkard e Haviland, 1924) e *Pygidopsis macrostomum* Travassos, 1928 também foram descritos sob condições experimentais e mostraram que estas espécies de trematódeos também utilizam no meio ambiente tanto *H. australis* quanto *P. vivipara*. Como hospedeiro definitivo experimental foram utilizados hamsters *Mesocricetus auratus* Waterhouse, 1839 (SIMÕES, 2009a; SIMÕES et al, 2009b). O ciclo de *Ascocotyle (Phagicola) longa* Ransom, 1920 também passa pelo molusco *H. australis* mas as metacercárias encistam nas tainhas *Mugil liza* Valenciennes, 1836 (SIMÕES et al., 2010; SANTOS et al., 2013).

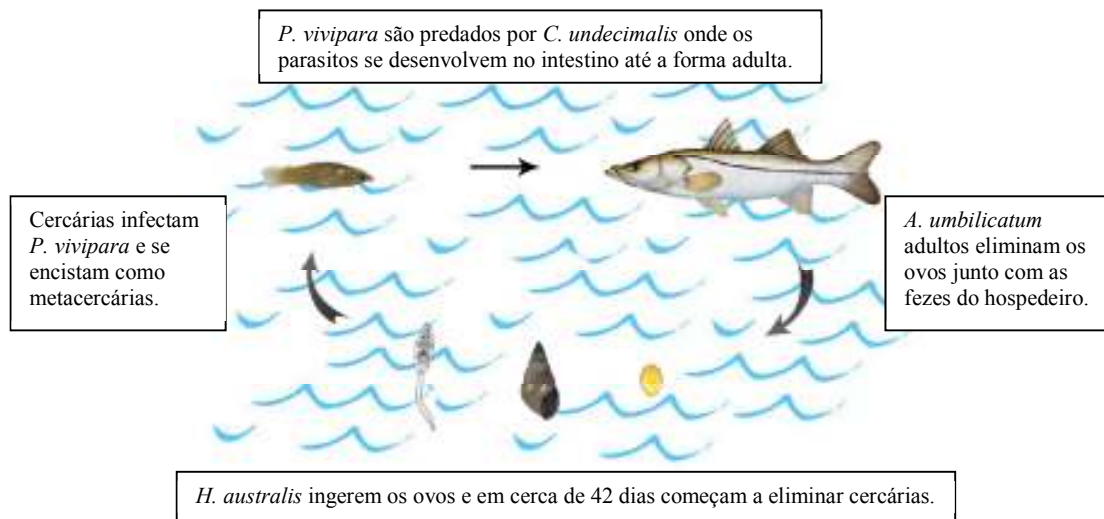


Figura 2. Ciclo de vida de *Acanthocolaritrema umbilicatum* adaptado de Simões et al. (2008)

Após o conhecimento e estabelecimento destes ciclos de vida em condições experimentais, as possíveis alterações comportamentais dos hospedeiros intermediários, devido à influência dos parasitos, começaram a ser analisadas em laboratório. Um primeiro ensaio comportamental foi realizado com *P. vivipara* para avaliar a atividade locomotora dos peixes antes e após infecções experimentais com cercárias de *A. umbilicatum* (SANTOS et al., 2011).

A avaliação do movimento destes peixes foi realizada através de um sistema de biomonitoramento capaz de capturar as imagens dos movimentos dos peixes e quantificá-las quanto ao tempo de repouso ou em movimento, distância percorrida e sua velocidade. Foram também realizadas infecções com diferentes intensidades de cercárias (30 e 50) para avaliar se haveria resposta com diferentes níveis de infecção. O estudo concluiu que peixes com baixa intensidade de metacercárias (< 10) não demonstraram qualquer alteração da atividade locomotora decorridas três a quatro semanas após as infecções experimentais. Quando o número de metacercária recuperadas aumentou (11 a 22) os peixes demonstraram um ligeiro aumento no tempo em que permaneceram em movimento. No entanto, hospedeiros que possuíam intensidade de infecção mais elevada (23 a 36), demonstraram uma diminuição significativa em todos os parâmetros da atividade locomotora evidenciando que peixes com intensidades elevadas de parasitos tendem a se manter maior tempo imóveis em comparação com peixes não infectados (SANTOS et. al, 2011).

Com base nestes experimentos é possível supor que as alterações na atividade locomotora dos hospedeiros possa implicar em consequências ecológicas, como por exemplo, na relação predador-presa como será discutido a seguir.

1.3 A influência dos parasitos sobre os hospedeiros

Existe atualmente uma crescente apreciação dos processos de interação que ocorrem entre os parasitos e seus hospedeiros. A idéia de que parasitos possam modificar o fenótipo de seus hospedeiros, a princípio, assemelha-se à uma história de ficção, mas agora é bem documentada nos estudos de comportamento animal (O'BRIEN, 2008)

Inúmeros organismos aquáticos são utilizados como modelos de estudo na ecologia comportamental na busca em avaliar o efeito do parasitismo nos seus hospedeiros. Peixes e moluscos tem demonstrado ser excelentes modelos nesta linha de pesquisa, onde seus movimentos e características morfológicas são mensuráveis nos experimentos (HAMMONDE-TOOKE et al., 2012; SANTOS et al., 2011; MILLER; POULIN et al., 2001). Embora tais evidências de alterações comportamentais sejam encontradas, a magnitude delas pode ser altamente variada de acordo com o período de desenvolvimento e a intensidade de parasitos no hospedeiro.

Bass e Wies (2009) por exemplo, estudaram o efeito da intensidade de metacercárias de *A. (P.) diminuta* e de *Echinochasmus schwartzi* Price, 1931 sobre o comportamento natatório do peixe Cyprinodontidae *Fundulus heteroclitus* (Linnaeus, 1766). Os autores observaram que peixes com altas intensidades de metacercárias nas brânquias (>1500) ficavam mais tempo na superfície da água e apresentavam maiores níveis de atividade natatória em comparação com populações de peixes com intensidades menores de parasitos. Os autores afirmaram que este comportamento supostamente poderia aumentar a transmissão trófica dos parasitos para seu hospedeiro definitivo (aves piscívoras).

A relação predador-presa em ambiente natural foi estudada por Lafferty e Morris (1996) que avaliaram o efeito do trematódeo *Euhaplorchis californiensis* Martin, 1950 em *Fundulus parvipinnis* Girard, 1854. Neste estudo os autores demonstraram que houve correlação significativa entre a intensidade de metacercárias encistadas no cérebro dos peixes com a frequência dos movimentos natatórios dos hospedeiro. O estudo ainda concluiu que estas alterações podem elevar em cerca de 30 vezes as chances dos peixes serem capturados por aves piscívoras (hospedeiros definitivos).

Alterações morfológicas de moluscos relacionadas a infecções parasitárias também foram relatadas no estudo de Hay, Fredensborg e Poulin (2005). Foram observadas alterações na morfologia das conchas dos moluscos *Zeacumantus subcarinatus* (Sowerby, 1855)

infectados apenas com *Acanthoparyphium* sp., ou por dupla infecção com *Maritrema novaezealandensis* Martorelli et al., 2004 e outra espécie de Philophtalmidae Loss, 1899. Os moluscos com dupla infecção apresentaram a base da concha mais larga do que os indivíduos infectados por apenas uma espécie ou não infectados. Os achados deste estudo sugeriam que as alterações na morfologia das conchas dos moluscos podem estar relacionadas à manipulação pelos parasitos que, através de uma resposta generalizada, podem até levar à castração do molusco intermediada pelo trematódeo.

A influência de *Schistosoma mansoni* na morfologia de *Biomphalaria glabrata* foi estudada por Gérard e Théron (1997), onde os autores discutiram o efeito da idade/tamanho devido parasitismo por este trematódeo. O tamanho da concha aumentada, o peso do tecido e a taxa de fecundidade estava alterada, mas de diferentes maneiras dependendo da idade e tempo de infecção no hospedeiro.

Parasitos são também capazes de alterar estruturas de interações sociais de seus hospedeiros (CROFT et al., 2011). Nesta linha de pesquisa, o comportamento e as interações sociais de guppies *P. reticulata* infectados e não infectados com *Gyrodactylus* sp. foram avaliados. O estudo concluiu que peixes infectados experimentalmente gastam menos tempo se associando com populações de peixes não infectados. Além disso, populações de peixes não infectados evitam a formação de cardumes com os peixes experimentalmente infectados. Em adição, a presença de indivíduos infectados resulta em um declínio contínuo nas interações de agrupamento social após a introdução de peixes infectados em um período de 24h. De modo diferente, o grupo não infectado apresentou uma relação positiva no agrupamento para um mesmo período. Os autores discutiram que é possível que as doenças parasitárias tenham implicações nas interações sociais, transmissão do patógeno e estrutura de relações sociais da população infectada em estudo.

De fato, os processos de alteração comportamental são comumente relatados em parasitos cujo ciclo de vida é complexo, onde a transmissão ocorre através da teia trófica (LONG et al., 2012). Em especial, os parasitos que precisam da transmissão trófica muitas vezes alteram o comportamento de seu hospedeiro intermediário de modo a aumentar a sua suscetibilidade à predação ou aumentar as chances de alcançar seu próximo hospedeiro (HAMMONDE-TOOKE et al., 2012; POULIN, 2010).

Segundo Barber, Hoare e Krause (2000), os parasitos que aumentam sua probabilidade de alcançar seus hospedeiros estariam, em aspectos evolutivos, ampliando seu processo de adaptação priorizando tais mecanismos. Lafferty (1999) definiu este processo como ‘parasitos que aumentam a transmissão trófica’ (*parasites increased trophic transmission* - PITT) para distinguir os outros processos de alteração comportamental. Entretanto, existem diferentes hipóteses para determinar os fatores que conduzem os parasitos a alterar o comportamento dos hospedeiros. Poulin (2002) estabeleceu as seguintes possibilidades: (1) os parasitos causam alterações de modo a aumentar as chances de completar seus ciclos de vida; (2) os parasitos alteram a fisiologia e bioquímica de seus hospedeiros que por sua vez reflete em mudanças no seu comportamento; (3) a possibilidade dos parasitos causarem alterações é uma habilidade adquirida de seus ancestrais e compartilhada com as demais espécies ou (4) os parasitos causam alterações porque desenvolveram a capacidade de ‘manipular’ o comportamento de seus hospedeiros, através de um processo de aprendizagem (como parte de sua programação genética ou então morrem).

Nos ensaios comportamentais, os organismos teste utilizados podem ser coletados diretamente de seu ambiente natural ou obtidos através de criação em laboratório. Nesta avaliação comportamental relacionada ao parasitismo, serão utilizados peixes (não infectados x infectados experimentalmente) e moluscos (não infectados x naturalmente infectados).

1.4 Modelos de Estudo

1.4.1 *Poecilia vivipara* Bloch e Schneider, 1801 (Poeciliidae)

Os poecilídeos apresentam uma ampla distribuição geográfica, sendo encontrados em todo o continente americano. Sua variedade de adaptação reprodutiva é notável, já que apenas uma das 150 espécies conhecidas não é vivípara (THIMBAULT; SCHULTZ, 1978). *Poecilia vivipara* (conhecido com ‘barrigudinho’) tem corpo alongado, comprimido posteriormente, sendo os machos geralmente menores do que as fêmeas. Os machos possuem um dos raios da nadadeira anal prolongado, formando o gonopódio, órgão copulador da espécie (IHERING, 1938) (**Figura 3**). Têm importância na teia trófica de ecossistemas lagunares, principalmente porque servem de alimento para peixes e aves piscívoras além de serem utilizados para o combate às larvas de mosquitos vetores de doenças (ANDREATA, 2012; SANTOS, 1958). São vivíparos e capazes de obter uma grande prole, em que uma única fertilização é suficiente para que a fêmea libere diversos filhotes, o que neste contexto facilita sua criação em laboratório, servindo de modelo em diferentes estudos experimentais (MEREDITH et al., 2010).



Figura 3. *Poecilia vivipara*. BORCATO (2011).

1.4.2 *Ascocotyle (Phagicola) pindoramensis* (Travassos, 1928) (Heterophyidae)

Trematoda Heterophyidae são frequentemente relatados como parasitos intestinais de aves piscívoras, e suas metacercárias se encistam em diferentes órgãos de peixes (SCHOLZ et al., 2001). *Ascocotyle (Phagicola) pindoramensis* possui um ciclo de vida complexo: os adultos vivem no intestino de aves piscívoras e liberam os ovos com as fezes do hospedeiro diretamente na água. Os ovos são ingeridos pelo molusco *H. australis* (primeiro hospedeiro intermediário) e nas glândulas digestivas os miracídios dão origem a esporocistos e a uma geração de rédias. As cercárias são a seguir liberadas e são ingeridas pelo peixe *P. vivipara* (segundo hospedeiro intermediário), se encistando como metacercárias nas brânquias e mesentério dos peixes. Mamíferos e aves piscívoras são os hospedeiros definitivos que se infectam pela ingestão de peixes parasitados; no intestino os parasitos se desenvolvem ao estágio adulto (**Figura 4**) (SIMÕES, 2009b).



Figura 4 . Ciclo de vida de *Ascocotyle (Phagicola) pindoramensis* (SIMÕES et al, 2006).

1.4.3 *Melanoides tuberculatus* (Müller, 1774) (Thiaridae)

No Brasil, a introdução de várias espécies de animais e vegetais, inclusive representantes do filo Mollusca como *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) (VEITENHEIMER-MENDES, 1981), *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (TELES et al., 1997) e *Melanoides tuberculatus* (VAZ et al., 1986) tem sido relatadas frequentemente nos últimos 10 anos (PINTO, 2009). Os moluscos tem um papel importante no ciclo de vida dos trematódeos digenéticos, porque servem como primeiro e frequentemente também como segundo hospedeiros intermediários, influenciando diretamente na distribuição dos parasitos (ESCH; CURTIS; BARGER, 2001, FALTÝNKOVÁ; NAŠINCOVÁ; KABLÁSKOVÁ, 2008). Além disso, alguns moluscos rapidamente alcançaram o *status* de espécie invasora causando impactos em ecossistemas aquáticos ou terrestres, econômico e social por todo Brasil (PINTO, 2009).

Melanoides tuberculatus (**Figura 5**) (caramujo trombeta), por exemplo, é um molusco introduzido que possui atualmente uma ampla distribuição por toda região Neotropical tendo sido encontrado na lagoa Rodrigo de Freitas Habitam águas lânticas ou lólicas e ambientes variando entre oligotróficos a eutróficos, se alimentando de partículas orgânicas e/ou microalgas encontradas no substrato. São bentônicos, dioicos, ovovivíparos, mas podem se reproduzir por partenogênese (PINTO, 2009).



Figura 5. *Melanoides tuberculatus*. KÜHNE (2011).

Este molusco é referido como hospedeiro intermediário bem adaptado, participando do ciclo de vida de pelo menos 16 famílias de trematódeos, em 25 gêneros e 37 espécies (PINTO, 2009).

1.4.4 *Centrocestus formosanus* (Nishigori, 1924) (Heterophyidae)

Este trematódeo utiliza *M. tuberculatus* como primeiro hospedeiro intermediário em seu ciclo de vida. Arizmendi (1992) descreveu este ciclo de vida (**Figura 6**) com cercárias em *M. tuberculatus*, metacercárias em *Mylopharyngodon piceus* (Richardson, 1846) e adultos obtidos experimentalmente em *Gallus gallus* (Linnaeus, 1758).

Este parasito já foi relatado causando a morte de pequenos peixes, devido à elevada intensidade de metacercárias nos indivíduos e há relatos de parasitismo em humanos (CHAI; LEE, 2002; CORTÉS et al., 2010, FRIED et al., 2004, SCHOLZ; SALGADO-MALDONADO, 2000).

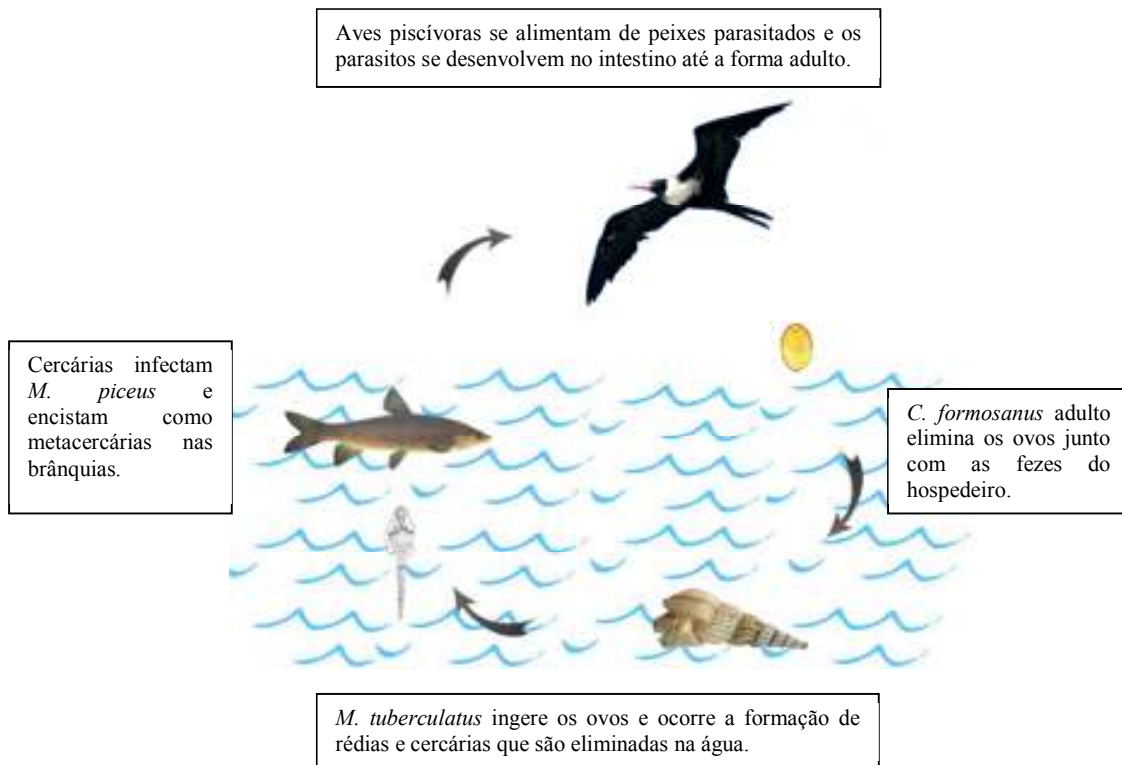


Figura 6. Ciclo de vida de *Centrocestus formosanus* (ARIZMENDI, 1992).

Neste trabalho nos demonstraremos dois estudos abordando o efeito do parasitismo na atividade locomotora de peixes e moluscos. No Capítulo 1 é demonstrado um estudo experimental da influência da intensidade e período de desenvolvimento de *Ascocotyle (Phagicola) pindoramensis* na atividade locomotora de *Poecilia vivipara*. No Capítulo 2 será apresentado um estudo comparativo da atividade locomotora de *Melanooides tuberculatus* não infectados e infectados naturalmente por *Centrocentus formosanus*.

CAPÍTULO I

ALTERAÇÃO DO COMPORTAMENTO NATATÓRIO DE PEIXES HOSPEDEIROS INDUZIDA PELO DESENVOLVIMENTO DO PARASITO

RESUMO

Parasitas com ciclos de vida complexos possuem a habilidade de alterar o comportamento de seus hospedeiros de modo a aumentar sua taxa de transmissão para o próximo hospedeiro. Entretanto, o nível das alterações comportamentais pode variar consideravelmente, dependendo do estágio de desenvolvimento do parasito e sua intensidade. Para investigar a influência de tais parâmetros, a atividade locomotora do peixe *Poecilia vivipara* foi avaliada antes de infecções experimentais, 7 dias pós-infecção (dpi), e 14 dpi com cercárias do digenea *Ascocotyle (Phagicola) pindoramensis*. A atividade locomotora foi monitorada utilizando um sistema de imagem, Videomex-V®, ligada à uma câmera capaz de gravar o atividade natatória dos peixes. No final dos experimentos, peixes foram dissecados e todas as metacercárias das brânquias e mesentério, locais específicos utilizados para esta espécie, foram recolhidas e contadas. Há uma diminuição significativa no comportamento natatório dos peixes decorrido 14 dpi. Similarmente, foi encontrado uma correlação significativa entre o comportamento natatório dos peixes e a intensidade de parasitos em ambos os locais de infecção. É possível supor que a diminuição da atividade locomotora de *P. vivipara* causada por *A. (P.) pindoramensis* possa interferir na relação predador-presa no ambiente natural.

Palavras-chave: alteração comportamental induzida pelo parasito, *Poecilia vivipara*, *Ascocotyle (Phagicola) pindoramensis*.

ABSTRACT

Parasites with complex life cycles have the ability to change the behavior of their intermediate host in a way that increases their transmission rate to the next host. However, the level of behavioral changes can vary considerably, depending on the stage of the parasite's development and parasite intensity. To investigate the influence of such parameters, we evaluated the locomotory activity of the fish *Poecilia vivipara* prior to experimental infections, 7 days post-infection (dpi) and 14 dpi with cercariae of the digenean *Ascocotyle (Phagicola) pindoramensis*. The locomotory activity was monitored using an image system, Videomex-V®, linked to with a video camera able to record the swimming behavior of the fishes. At the end of the experiments, fishes were dissected and all metacercariae from the gills and mesenteries, the specific sites utilized by this species, were recovered and conted. There was a significant decrease in the swimming behavior of fishes after 14 dpi. Similarly, we found a significant correlation between the swimming behavior of the fishes with parasite intensity in both sites of infection. It is surmised that the decrease in locomotory activity of *P. vivipara* caused by *A. (P.) pindoramensis* can disturb its predator-prey relationship in natural environment.

Key words: parasite induced behavioral changes, *Poecilia vivipara*, *Ascocotyle (Phagicola) pindoramensis*.

1. INTRODUÇÃO

Parasitos são capazes de afetar vários aspectos da biologia de seus hospedeiros, tais como a morfologia, fisiologia e comportamento, frequentemente aumentando sua susceptibilidade à predação e aumentando a transmissão do parasito, como tem sido observado para algumas espécies de parasitos transmitidos através da teia trófica (CRANE et al., 2011; LONG, 2012; HAMMONDE-TOOKE et al., 2012). Entretanto, a magnitude destes efeitos pode ser altamente variável dependendo do estágio de desenvolvimento do parasito e a intensidade da infecção.

De acordo com Poulin (1994) e Shirakashi e Goeter (2002) os efeitos da intensidade de parasitos no comportamento do hospedeiro pode ser acumulativo, então, com o aumento da intensidade, o grau de alteração comportamental deveria ter um aumento aproximadamente linear. Shirakashi e Goater (2005) também discutiram que as evidências da adaptação dos parasitos podem ser encontradas quando o período de alteração comportamental do hospedeiro coincide com o período de infectividade do parasito, isto é, período em que o parasito está apto a infectar seu próximo hospedeiro.

Ambos os conceitos foram apresentados em nossos estudos anteriores com *Poecilia vivipara* Bloch e Schneider, 1801, hospedeiro intermediário do trematódeo *Acanthocolaritrema umbilicatum* Travassos, Freitas e Bührnheim, 1965 (SANTOS et al., 2011), onde ocorrem como metacercárias encistadas na musculatura. A baixa intensidade de metacercárias teve pouco efeito sobre a atividade locomotora de peixes após três ou quatro semanas pós-infecção. Entretanto, quando a intensidade de parasitos aumentou, as alterações comportamentais tornaram-se evidentes.

Os peixes têm sido utilizados como bons modelos em pesquisas de alterações comportamentais, onde o comportamento natatório é medido como um parâmetro nos experimentos (HAMMONDE-TOOKE et al., 2012; SANTOS et al., 2011; Richard et al., 2010). Guppies, por exemplo, são pequenos peixes tropicais frequentemente utilizados como modelos ecológicos e evolutivos, e amplamente utilizados em ensaios comportamentais (RICHARD et al., 2010). *P. vivipara* é um peixe comumente encontrado em pequenos rios, riachos e ecossistemas costeiros do Brasil. Este peixe tem sido encontrado naturalmente parasitado por metacercárias de *Ascocotyle (Phagicola) pindoramensis* (Travassos, 1928) na lagoa Rodrigo de Freitas, Rio de Janeiro, Brasil.

A. (P.) pindoramensis é um trematódeo heterophíideo com ciclo de vida complexo, incluindo o molusco *Heleobia australis* (d'Orbigny, 1835) como primeiro hospedeiro intermediário, *P. vivipara* como segundo hospedeiro intermediário e aves piscívoras como hospedeiros definitivos (SIMÕES et al., 2006). Durante as infecções experimentais, Simões et al. (2006) observaram que brânquias e mesentério são os sítios específicos deste parasito. Neste contexto, será possível que este parasito seja capaz de alterar o comportamento natatório de seu hospedeiro? A meta do presente estudo foi avaliar a influência da intensidade de metacercárias de *Ascocotyle (Phagicola) pindoramensis* em ambos os sítios de infecção e seu estágio de desenvolvimento na atividade locomotora de *Poecilia vivipara*, sob condições experimentais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Nota ética

A coleta e a utilização dos peixes estão licenciadas pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA autorização nº 02/2004), Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA-FIOCRUZ nº LW-12/10) e Comissão de Biossegurança do Instituto Oswaldo Cruz.

2.2 Animais

Oito *Poecilia vivipara* naturalmente infectados coletados da lagoa Rodrigo de Freitas foram necropsiados e as brânquias e mesentério oferecidas ao hamsters *Mesocricetus auratus* Waterhouse, 1839 durante três dias consecutivos. No quarto dia pós-infecção o hamster foi sacrificado e o intestino delgado removido para obtenção de *Ascocotyle (Phagicola) pindoramensis* adultos. Os Trematoda foram identificados segundo Simões et al. (2006). Moluscos *Heleobia australis* nascidos e criados em laboratório foram expostos à infecção colocando em seu aquário ovos de *A. (P.) pindoramensis* obtidos destas infecções. Quarenta e dois dias pós-infecção (dpi), as cercárias começaram a ser eliminadas e utilizadas nas infecções experimentais em peixes (SIMÕES et al., 2009a).

Quatorze machos e dezesseis fêmeas adultas não infectadas de *P. vivipara* nascidos e criados em laboratório, pesando 0,08–0,17g, com comprimento padrão de 15–24 mm e 4–5 meses de idade, foram utilizados nos experimentos. Os peixes não foram alimentados por 12 h antes dos experimentos. Os movimentos de cada peixe foram filmados e analisados usando um sistema de monitoramento por imagem antes das infecções, formando então seu próprio ‘grupo controle’.

Cada peixe foi individualizado em um recipiente de vidro e expostos a 40 cercárias de *A. (P.) pindoramensis* por 2 h ou até que a última cercária tivesse desaparecido do recipiente. Para avaliar se o estágio de desenvolvimento do parasito poderia influenciar na atividade locomotora dos peixes, o monitoramento do seu comportamento locomotor foi monitorado durante três períodos distintos: (1) antes das infecções experimentais com cercárias (peixes não infectados ou 0); (2) 7 dpi e (3) 14 dpi. No final dos experimentos, os peixes foram dissecados e todas as metacercárias recolhidas foram isoladas e contadas para analisar a correlação com a atividade locomotora.

2.3 Sistema de biomonitoramento por análise de imagem

O sistema de biomonitoramento por análise de imagem (**Figura 1**) está baseado no Videomex-V® (Columbus Instruments, Ohio, USA) usando o programa *Travelled Distance of Multiple Objects* (MAGALHÃES et al., 2007; SANTOS et al., 2011). As análises estatísticas foram realizadas usando as medidas de cinco parâmetros comportamentais: Distância Percorrida, Tempo Ambulatorial, Tempo Estereotipado, Tempo em Repouso e Velocidade Média. ‘Distância Percorrida’ é a distância total (mm) percorrida pelo animal durante um intervalo. ‘Tempo Ambulatorial’ é o número total em segundos durante um intervalo em que um animal gasta se deslocando. ‘Tempo Estereotipado’ é o número total em segundos durante um intervalo em que o animal faz alguma atividade que não seja se deslocar. ‘Tempo em Repouso’ é o número total de segundos durante um intervalo gasto sem se mover. “Velocidade Média” de um animal é calculada como a distância percorrida dividida pelo tempo ambulatorial.

A cabine de gravação é feita de acrílico e mantém uma câmera de vídeo analógica e distribuição de luz fraca. Dentro dela, há um aquário de vidro opaco de 30L de capacidade (35 × 35 × 25cm) que contém quatro caixas de contenção (9,5 × 5,5 × 2cm cada) feitas de acrílico opaco com orifícios de 3mm, onde os peixes são colocados individualmente durante os experimentos. Os peixes foram mantidos em água filtrada e desclorada com oxigênio (6,0 ± 0,25 mg/dL), temperatura (24,1 ± 0,65°C) e pH (6,1 ± 0,25) sendo controlados; bombas submersas mantiveram a água em circulação. Cada experimento teve duração de 4h, com 1h de período de aclimação e 3h de gravação. O período de monitoramento foi gravado em 60 intervalos de 3 min e todos os valores de cada intervalo da Distância Percorrida, Tempo

Ambulatorial, Tempo Estereotipado, Tempo em Repouso e Velocidade Média foram usados nos testes estatísticos.

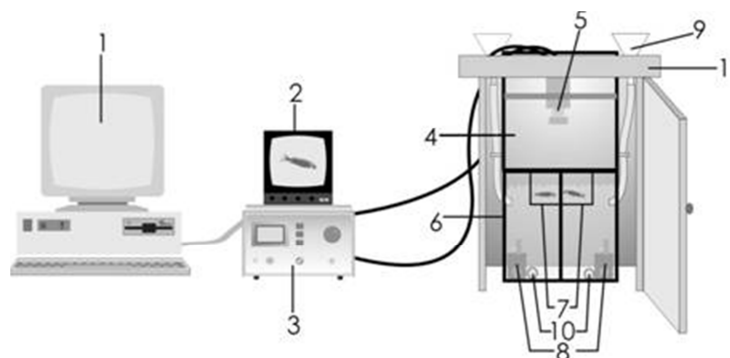


Figura 1 - Desenho esquemático do sistema de biomonitoramento por análise de imagem: 1= microcomputador com software armazenador de dados em tempo real e gerador de planilha Excel; 2=monitor de vídeo; 3= analisador de imagens em tempo real Videomex-V®; 4 = cabine de registro em acrílico; 5 = câmera de vídeo; 6= aquário de acrílico; 7 = câmara de acrílico de exposição subdividida em oito boxes de contenção; 8= aeradores; 9= funil de vidro com tubo flexível de borracha de silicone; 10 = saídas para escoamento dos compartimentos (Adaptado de Magalhães et al., 2007).

2.4 Análises estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o programa R, versão 2.15.0 (R Development Core Team, 2012). O teste *t* de *Student* foi usado para comparar a intensidade de metacercárias recuperadas entre machos e fêmeas e também a intensidade de metacercárias recuperadas entre brânquias e mesentério. Os dados usados neste teste foram transformados em log de modo a encontrar os requerimentos para pressupostos paramétricos.

As análises do comportamento dos peixes foram conduzidas usando o Modelo Linear Generalizado (MLG) com estimativas através das Equações de Estimação Generalizada (EEG) com suporte do pacote ‘geepack’ e ‘yags’(HØJSGAARD et al., 2006). Este teste analisou as medidas repetidas da atividade locomotora estimando os parâmetros de regressão e variância em um tempo dependente. Então, o modelo foi feito usando cada parâmetro comportamental como uma variável resposta com erro de distribuição Gaussiana, função de ligação identidade e estrutura de correlação independente. Fatores não significativos, levando em consideração o intervalo de confiança e a estimativa robusta foram removidos do modelo EEG para obter o modelo final.

O modelo mais parcimonioso foi adquirido com base no Critério de Informação de Quase-verossimilhança (CIQ) (PAN, 2001). Finalmente, foram analisados os efeitos das variáveis explicativas: comprimento, peso, sexo, período do experimento (não infectados, 7dpi e 14 dpi), intensidade de metacercárias recolhidas das brânquias ou mesentério e a intensidade total de metacercárias na atividade locomotora dos peixes. O nível de significância assumido nos testes estatísticos foi de 5%.

3. RESULTADOS

Os machos mediam $17,4 \pm 1,9$ (15–20) mm ($N=14$) de comprimento padrão e pesavam $0,09 \pm 0,01$ (0,08–0,11) g. As fêmeas mediam $18,3 \pm 2,6$ (15–24) mm ($N=16$) e pesavam $0,10 \pm 0,02$ (0,08–0,17) g. Após análises, a EEG não encontrou associações entre a atividade locomotora dos peixes com o peso, comprimento e sexo (todas as análises $P>0,05$), sendo então removidos do modelo final.

Em relação aos períodos do experimento, as análises das EEG não encontraram alterações na atividade locomotora decorridos 7 dpi (todos os parâmetros comportamentais com $P > 0,05$) (**Figura 2 A–E**). Entretanto, após 14 dpi, os peixes reduziram sua atividade locomotora, exibindo uma diferença significativa nos parâmetros Tempo Estereotipado (não infectado vs 14 dpi, coeficiente estimado = $-10,04 \pm 1,00$, Wald = 98,99, $P < 0,001$) (**Figura 2 C**) e Tempo em Repouso (não infectados vs 14 dpi, coeficiente estimado = $9,40 \pm 1,21$, Wald = 60,17, $P < 0,001$) (**Figura 2 D**).

Todos os peixes experimentalmente infectados ($N=30$) foram dissecados no final dos experimentos e continham metacercárias nas brânquias e mesentério. A intensidade média de metacercárias recuperadas das brânquias e mesentério de peixes machos foi $9,5 \pm 1,29$ (8–12) e peixes fêmea $9,4 \pm 1,31$ (8–12). A intensidade média de metacercárias recuperadas das brânquias de todos os peixes foi $4,3 \pm 1,12$ (2–7); entretanto, nos peixes machos foi $4,4 \pm 1,29$ (2–7) e nas fêmeas $4,2 \pm 0,90$ (3–6). Das metacercárias recuperadas do mesentério, a intensidade média de todos os peixes foi $5,1 \pm 0,95$ (3–8), para os peixes macho $5,0 \pm 0,88$ (3–6) e para peixes fêmea foi de $5,1 \pm 0,99$ (4–8).

Não foram encontradas diferenças significativas quando foi feita a comparação entre a intensidade de metacercárias das brânquias dos peixes machos e fêmeas (teste de Student, $t=0,15$, $P=0,87$), assim como as obtidas no mesentério ($t=1,24$, $P=0,21$). Entretanto, existem diferenças significativas quando comparados a intensidade de metacercárias recuperadas nas brânquias em relação às do mesentério, com a última apresentando valores ligeiramente maiores (teste de Student, $t=-2,98$, $P=0,004$).

Não foram encontrados efeitos de metacercárias das brânquias considerando os parâmetros comportamentais Distância Percorrida (coeficiente estimado = $0,35 \pm 2,45$, Wald = 0,02, $P=0,88$, **Figura 3 A**), Tempo Ambulatorial (coeficiente estimado = $-0,22 \pm 0,15$, Wald = 2,12, $P=0,18$) (**Figura 3 B**) e Velocidade Média (coeficiente estimado = $0,99 \pm 0,05$, Wald = 2,76, $P=0,09$) (**Figura 3 E**). Similarmente, a intensidade de metacercárias do mesentério não influenciou os parâmetros Distância Percorrida (coeficiente estimado = $2,96 \pm 2,90$, Wald = 1,04, $P=0,31$) (**Figura 4 A**), Tempo Ambulatorial (coeficiente estimado = $0,31 \pm 0,20$, Wald = 2,43, $P=0,12$) (**Figura 4 B**), Tempo em Repouso (coeficiente estimado = $0,76 \pm 0,49$, Wald = 2,40, $P=0,12$) (**Figura 4 D**) e Velocidade Média (coeficiente estimado = $0,08 \pm 0,09$, Wald = 0,79, $P=0,37$) (**Figura 4 E**).

No entanto, as análises das EEG encontraram um efeito significativo de metacercárias das brânquias para Tempo Estereotipado (coeficiente estimado = $-1,09 \pm 0,40$, Wald = 7,35, $P=0,006$) (**Figura 3 C**) e Tempo em Repouso (coeficiente estimado = $1,32 \pm 0,46$, Wald = 8,12, $P=0,004$) (**Figura 3 D**). Similarmente, foi encontrado um efeito significativo de metacercárias do mesentério somente para o Tempo Estereotipado (coeficiente estimado = $-1,08 \pm 0,44$, Wald = 5,82, $P=0,01$) (**Figura 4 C**).

A influência da intensidade total de metacercárias (brânquias e mesentério) na atividade locomotora dos peixes foi analisada e encontrados efeitos significativos no Tempo Estereotipado (coeficiente estimado = $-1,08 \pm 0,32$, Wald = 10,97, $P=0,0009$) (**Figura 5 C**) e Tempo em Repouso (coeficiente estimado = $1,09 \pm 0,38$, Wald = 8,04, $P=0,004$) (**Figura 5 D**). Entretanto, não foram encontrados efeitos significativos para Distância Percorrida (coeficiente estimado = $1,40 \pm 2,13$, Wald = 0,43, $P=0,51$) (**Figura 5 A**), Tempo Ambulatorial (coeficiente estimado = $-0,007 \pm 0,14$, Wald = 0,00, $P=0,96$) (**Figura 5 B**) e Velocidade Média (coeficiente estimado = $0,09 \pm 0,05$, Wald = 3,25, $P=0,07$) (**Figura 5 E**).

Finalmente, para avaliar o padrão da atividade locomotora dos peixes em relação ao período dos experimentos, os 60 intervalos de monitoramento em cada um dos três períodos distintos (0, 7 e 14 dpi) foram analisados para ver se eram constantes ou variados. Então, peixes não infectados e mesmo decorridos 7 dpi não mostraram diferenças significativas em nenhum dos parâmetros comportamentais ($P > 0,05$), mas aqueles peixes com 14 dpi

mostraram diferenças significativas para o Tempo Estereotipado (coeficiente estimado = $-0,07 \pm 0,03$, Wald = 4,03, $P= 0,04$) e Tempo em Repouso (coeficiente estimado = $0,11 \pm 0,04$, Wald = 6,51, $P = 0,01$).

Tabela 1. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros comportamentais de *Poecilia vivipara* a cada intervalo de monitoramento (3 min) durante 3h, nos três períodos do experimento.

Parâmetros comportamentais	Não infectados		7 dias pós-infecção		14 dias pós-infecção	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
Distância Percorrida (mm)	278,8	273,3	293,2	279,4	291,4	285,6
Tempo Ambulatorial (seg)	26,8	19,1	27,5	19,1	27,5	19,2
Tempo Estereotipado (seg)	51,3	28,9	51,2	28,7	41,3	24,1
Tempo em Repouso (seg)	101,7	35,3	101,2	34,2	111,1	30,7
Velocidade Média (mm/seg)	9,8	6,1	10	6,1	9,7	6,1

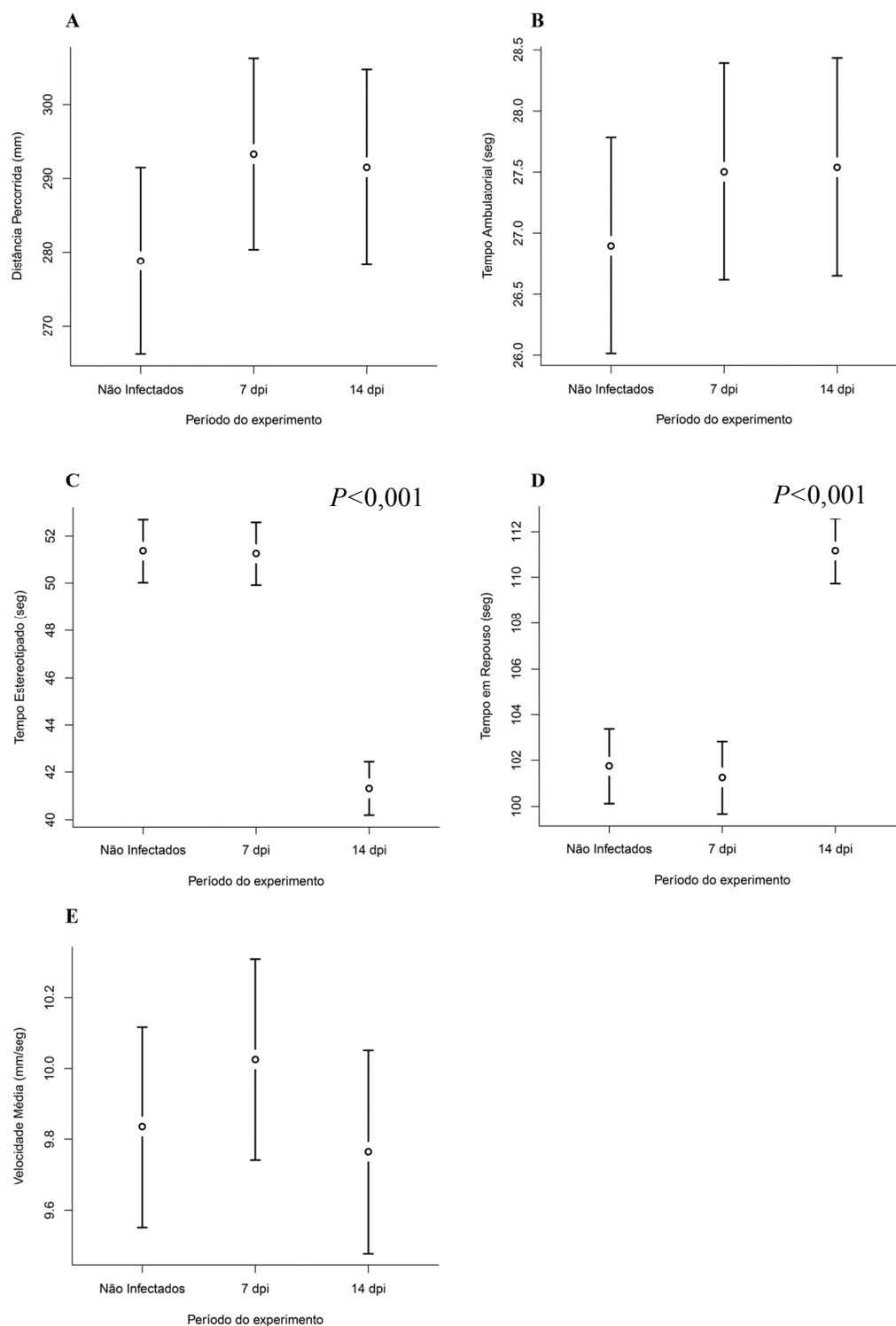


Figura 2. (A-E) Gráficos comparativos dos parâmetros comportamentais de *Poecilia vivipara* antes das infecções (Não infectados), 7 dpi e 14 dpi por 40 cercárias de *Ascocotyle (Phagicola) pindoramensis*. A. Distância percorrida (mm), B. Tempo Ambulatorial (segundos), C. Tempo Estereotipado (segundos), D. Tempo em Repouso (segundos) e E. Velocidade média (mm/s). Barras mostram a média \pm 95% intervalos de confiança.

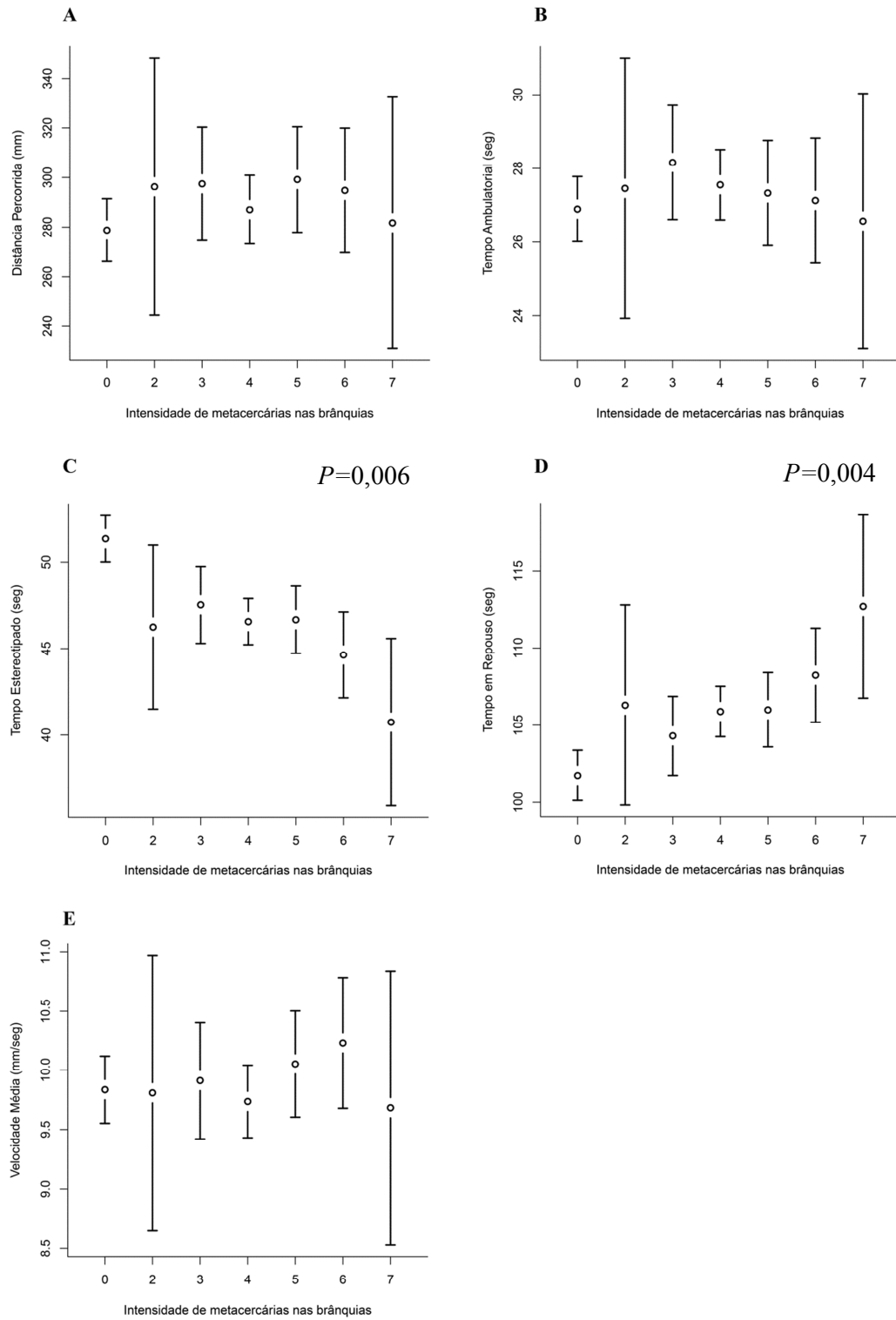


Figura 3. (A-E) Gráficos de correlação dos parâmetros comportamentais de *Poecilia vivipara* e intensidade de metacercárias de *Ascocotyle (Phagicola) pindoramensis* recuperadas das brânquias. A. Distância percorrida (mm), B. Tempo Ambulatorial (segundos), C. Tempo Esterectipado (segundos), D. Tempo em Repouso (segundos) e E. Velocidade média (mm/s). Barras mostram a média \pm 95% intervalos de confiança.

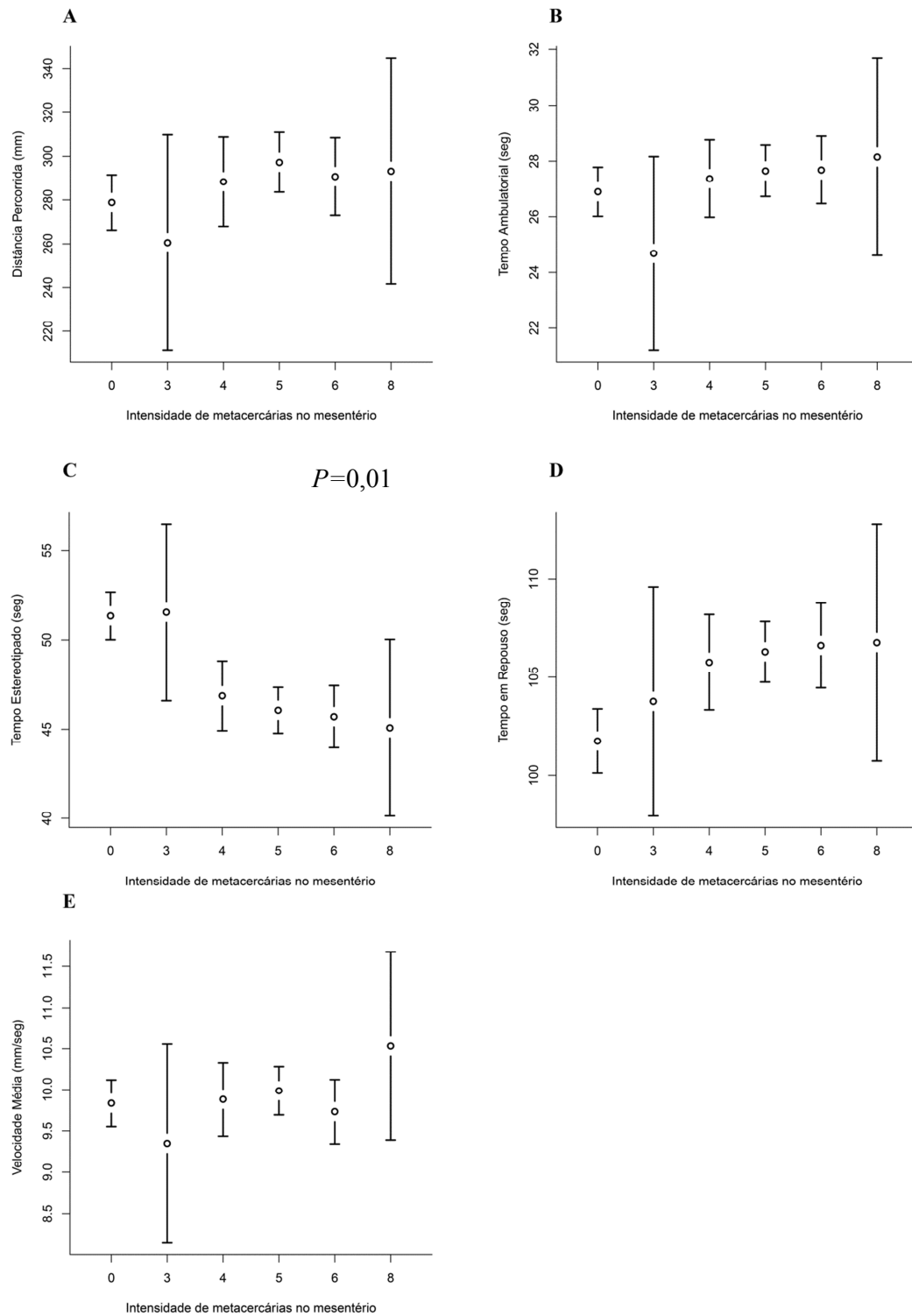


Figura 4. (A-E) Gráficos de correlação dos parâmetros comportamentais de *Poecilia vivipara* e intensidade de metacercárias de *Ascocotyle (Phagicola) pindoramensis* recuperadas do mesentério. A. Distância percorrida (mm), B. Tempo Ambulatorial (segundos), C. Tempo Estereotipado (segundos), D. Tempo em Repouso (segundos) e E. Velocidade média (mm/s). Barras mostram a média \pm 95% intervalos de confiança.

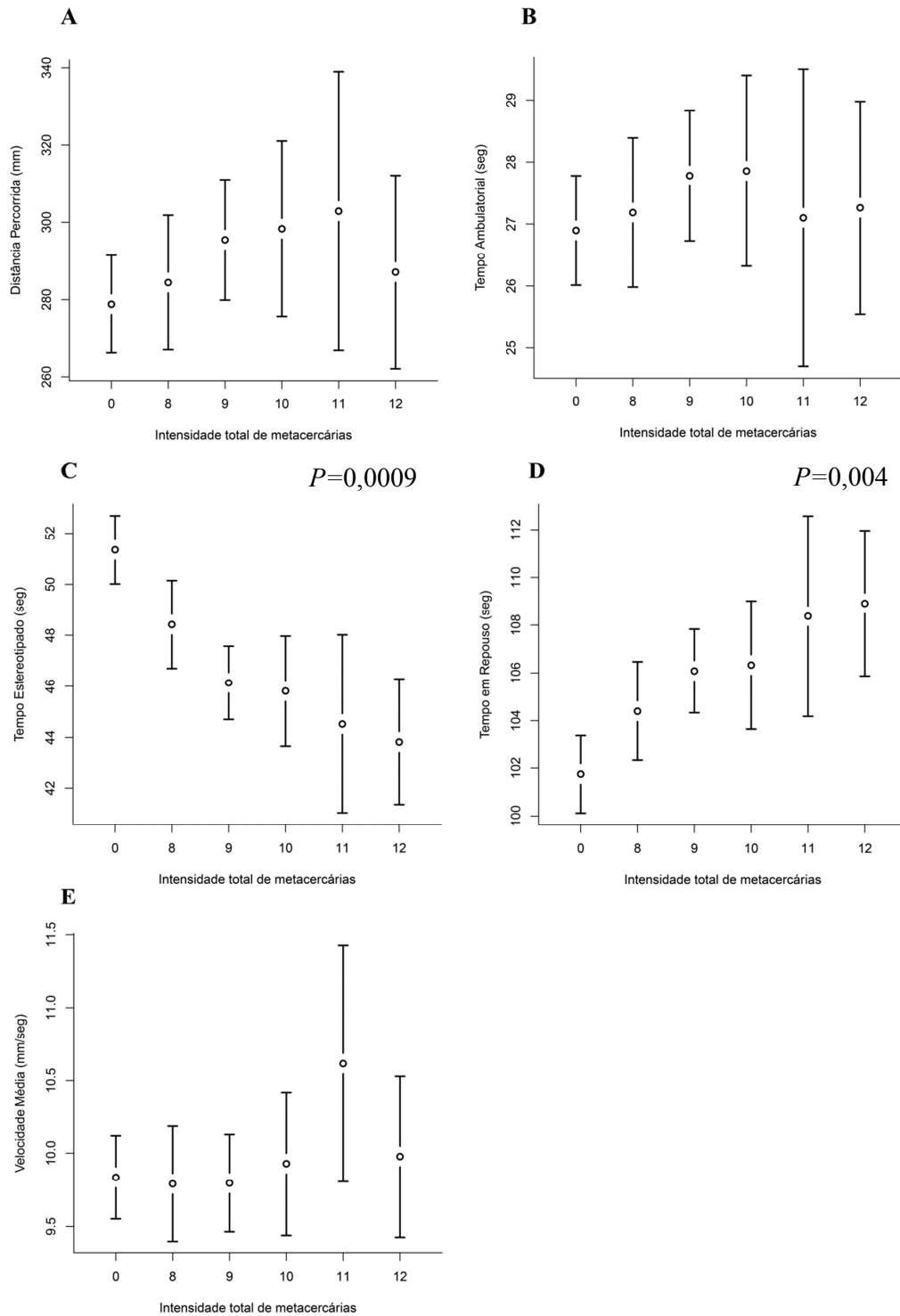


Figura 5. (A-E) Gráficos de correlação dos parâmetros comportamentais de *Poecilia vivipara* e intensidade de metacercárias de *Ascocotyle (Phagicola) pindoramensis* recuperadas das brânquias e do mesentério. A. Distância percorrida (mm), B. Tempo Ambulatorial (segundos), C. Tempo Estereotipado (segundos), D. Tempo em Repouso (segundos) e E. Velocidade média (mm/s). Barras mostram a média \pm 95% intervalos de confiança.

4. DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou que *Ascocotyle (Phagicola) pindoramensis* é capaz de alterar a atividade locomotora de *Poecilia vivipara* dependendo do estágio de desenvolvimento e intensidade de parasitos. Peso, comprimento e sexo não apresentaram qualquer correlação com a atividade locomotora dos peixes. Diferenças significativas foram encontradas quando comparamos o número de metacercárias recuperadas das brânquias e mesentério sendo que as metacercárias de *A. (P.) pindoramensis* parecem ser mais bem sucedidas em infectar o mesentério do que as brânquias de *P. vivipara*, independente do gênero do hospedeiro.

Levando em conta que nenhuma diferença foi encontrada em qualquer dos parâmetros comportamentais com a atividade locomotora dos peixes com 7 dpi, no entanto, após 14 dpi os parasitos influenciaram significativamente a atividade locomotora dos guppies. Uma correlação significativa foi encontrada entre a intensidade total de metacercárias e o Tempo Estereotipado, mesmo com baixa intensidade de parasitos (8–12 parasitos/hospedeiro). O oposto ocorreu em relação ao Tempo em Repouso, onde a intensidade de parasitos estava correlacionada positivamente com o aumento dos períodos de inatividade do peixe. Entretanto, quando consideramos a intensidade de parasito em cada sítio de infecção (brânquias e mesentério), foi encontrada uma relação significativa entre a intensidade de parasitos das brânquias com o Tempo Estereotipado e Tempo em Repouso (2–7 parasitos/hospedeiro). Similarmente, houve correlação significativa entre a intensidade de parasitos do mesentério com o Tempo Estereotipado, mas isto não ocorreu com Tempo em Repouso, mesmo com um ligeiro aumento da intensidade de parasitos (3–8 parasitos/hospedeiro). Isto realça o efeito em potencial que metacercárias exercem nas brânquias do que no mesentério.

Em nossos estudos anteriores, demonstramos que metacercárias de *Acanthocolaritrema umblicatum* encistadas na musculatura de *P. vivipara* (23–36 parasitos/hospedeiro), 3 a 4 semanas pós infecção, causavam uma diminuição em todos os parâmetros da atividade locomotora dos peixes (SANTOS et al., 2011). Similarmente, Shirakashi e Goater (2002) referiram que peixes jovens (15–20mm) infectados com metacercárias de *Ornithodiplostomum ptychocheilus* Faust, 1917 no cérebro, mesmo em baixa intensidade (3 ± 3 parasitos/hospedeiro), tinham uma diminuição significativa da performance locomotora comparado ao grupo controle. Não sabemos exatamente como *A. (P.) pindoramensis* altera a atividade locomotora de *P. vivipara*, entretanto uma possibilidade pode ser a limitação energética, onde os recursos do hospedeiro devem ter sido utilizados pelos parasitos. Além disso, a infecção pode aumentar o custo metabólico para locomoção (BARBER; HOARE; KRAUSE, 2000). Em vista dos resultados acima, parece provável que a diminuição da atividade locomotora causada por este parasito tenha amplas efeitos ecológicos no comportamento de seus hospedeiros e conseqüentemente, no relacionamento predador-presa no ambiente natural.

5. CONCLUSÃO

Há evidências que *Ascocotyle (Phagicola) pindoramensis* seja capaz de alterar o comportamento de *Poecilia vivipara* de maneira a diminuir sua atividade natatória somente a partir de 14 dpi, ou ainda conforme a intensidade da infecção. Embora, a intensidade de parasitos seja maior no mesentério, as metacercárias nas brânquias parecem exercer um maior efeito no comportamento natatório dos peixes. É provável que peixes que permaneçam imóveis por maior tempo podem ser um alvo mais fácil para aves e peixes predadores que utilizam o ‘bote’ ou ‘emboscada’ como tática principal de forrageamento. É possível portanto que esta alteração possa ter outras conseqüências na ecologia dos hospedeiros em seu ambiente natural

CAPÍTULO – II

O QUE FAZ O TREMATODA *CENTROCESTUS FORMOSANUS* (HETEROPHYIDAE) AFETAR A ATIVIDADE LOCOMOTORA DE *MELANOIDES TUBERCULATUS* (THIARIDAE)?

RESUMO

Melanoides tuberculatus (Müller, 1774) (Thiaridae) é um molusco introduzido que atualmente possui uma ampla distribuição por toda região Neotropical e é o hospedeiro intermediário do trematódeo *Centrocestus formosanus* (Nishigori, 1924) (Heterophyidae), considerado patogênico para humanos. A meta do presente trabalho foi avaliar a atividade locomotora de *M. tuberculatus* não infectados comparando-os com os naturalmente infectados por *C. formosanus*. A atividade locomotora de cada molusco foi gravada através de um sistema de biomonitoramento por análise de imagem Videomex-V® para avaliar e quantificar os parâmetros 'Tempo Estereotipado' e Tempo em Repouso'. *M. tuberculatus* infectados com *C. formosanus* apresentaram um comportamento reduzido e irregular de movimentos em comparação com moluscos não infectados. *C. formosanus* é capaz de alterar a atividade locomotora de *M. tuberculatus* independente do seu comprimento.

Palavras-chave: alterações comportamentais, Mollusca, parasitos.

ABSTRACT

Melanooides tuberculatus (Müller, 1774) (Thiaridae), an introduced mollusk which nowadays has a wide Neotropical geographical distribution, is the intermediate host of the trematode *Centrocestus formosanus* (Nishigori, 1924) (Heterophyidae), considered to be pathogenic to humans. The aim of the present work was to evaluate the locomotory activity of *M. tuberculatus* uninfected comparing with those naturally infected with *C. formosanus*. The locomotory activity of each mollusk was recorded using an image analysis biomonitoring system Videomex-V® to evaluate and quantify the parameters of 'Stereotypic' and 'Resting time'. *M. tuberculatus* infected with *C. formosanus*, apart from the reduced movement, presented an irregular locomotory activity pattern, contrary to the uninfected mollusks. *Centrocestus formosanus* is able to alter the locomotory activity of *Melanooides tuberculatus* irrespective to the standard length.

Key words: Behavioral changes, Mollusca, parasites

1. INTRODUÇÃO

Infecções parasitárias podem alterar a fisiologia e comportamento de seus hospedeiros em um contexto ecológico e tais alterações podem expor os hospedeiros a vários predadores (KOLLURU et al., 2011). Parasitos que utilizam moluscos como hospedeiro intermediário podem, durante a sua reprodução assexuada, explorar recursos do hospedeiro causando efeitos imediatos em sua fisiologia (MILLER; POULIN, 2001). Levri et al., 2007 demonstraram que estádios intramolusco de *Microphallus* sp. é capaz de alterar a taxa de movimento em resposta à luz e movimento vertical do molusco *Potamopyrgus antipodorum* (Gray, 1853), possivelmente aumentando a transmissão do parasito para o próximo hospedeiro e diminuindo a probabilidade do hospedeiro ser capturado por outro predador.

Ambientes aquáticos oferecem condições ideais para o desenvolvimento e manutenção do ciclo de vida de parasito, principalmente porque a fluidez da água facilita a dispersão dos ovos e estágio larvares, possibilitando a manutenção do ciclo de vida de parasitos mais complexos (BARBER; POULIN 2002). No ecossistema da lagoa Rodrigo de Freitas, Rio de Janeiro, Brasil, o ciclo de vida de diferentes espécies de digenea foram elucidados (SIMÕES et al. 2006, 2008, 2009, 2010), o que nos possibilitou realizar um estudo utilizando um sistema de biomonitoramento por análise de imagem para comparar o comportamento locomotor de peixes hospedeiro intermediário antes e após infecções experimentais com cercárias (SANTOS et al. 2011). Embora a fauna de aves e peixes da lagoa esteja bem referida, existem poucos estudos sobre moluscos da região (SIMÕES et al. 2008), e entre eles destaca-se *Melanoides tuberculatus* (Müller, 1774) (Thiaridae), um molusco introduzido que atualmente possui uma ampla distribuição por toda região Neotropical (GIOVANELLI et al., 2005).

M. tuberculatus é relatado por ser bem um hospedeiro intermediário bem adaptado com pelo menos 16 famílias de trematódeos incluindo 25 gêneros e 37 espécies (PINTO 2009). Entre este, *Centrocestus formosanus* (Nishigori, 1924) é considerado por ser um patogênico ao homem e capaz de causar morte a pequenos peixes resultado de uma elevada quantidade de metacercárias (CÓRTEZ et al., 2010, FRIED et al., 2004, SCHOLZ; SALGADO-MALDONADO, 2000). Embora seu impacto negativo em peixes segundo hospedeiro intermediário e humanos esteja bem conhecido, os efeitos do parasitismo de *C. formosanus* sob *M. tuberculatus* necessitam de mais investigações.

A meta do presente estudo é avaliar se *C. formosanus* é capaz de alterar a atividade locomotora de *Melanoides tuberculatus*, comparando moluscos naturalmente infectados com não infectados utilizando um sistema de biomonitoramento por análise de imagem.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Nota ética

A coleta e a utilização dos moluscos estão licenciadas pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA autorização nº 02/2004), Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA-FIOCRUZ nº LW-12/10) e Comissão de Biossegurança do Instituto Oswaldo Cruz.

2.2 Coleta e análise de moluscos

Um total de 65 moluscos *M. tuberculatus* (15–25mm de comprimento) foram aleatoriamente coletados em um único sítio às margens da lagoa Rodrigo de Freitas, Rio de Janeiro, Brasil (22°97'00''S, 43°21'65''W) e mantidos vivos em aquário no laboratório com

água filtrada da lagoa e alimentados com comida comercial para peixes.. Os moluscos em seguida foram individualizados em um recipiente com 20 ml com água filtrada da lagoa e expostos à luz artificial por quatro horas e examinados sob um microscópio estereoscópico. Durante três meses os moluscos foram semanalmente examinados para visualização de cercárias. As cercárias eliminadas foram identificadas como *Centrocestus formosanus* de acordo com Scholz e Salgado-Maldonado (2000). Os moluscos foram a seguir separados em dois grupos: infectados e não infectados. Após os experimentos, todos os moluscos foram examinados para confirmar a presença ou ausência de parasitos como previamente estabelecido.

2.3 Sistema de Biomonitoramento por Análise de Imagem (SBAI)

O sistema de biomonitoramento por análise de imagem está baseado no Videomex-V® (Columbus Instruments, Ohio, USA) (MAGALHÃES et al., 2007; SANTOS et al., 2011). O SBAI é composto por uma cabine de iluminação e uma cabine de gravação feita de acrílico que mantém uma câmera de vídeo analógica. As imagens são enviadas ao Videomex-V® (Columbus Instruments, Ohio, USA) e analisadas utilizando o programa *Travelled Distance of Multiple Objects*. Os dados dos movimentos são enviados a um computador e armazenados em planilha Excel.

Durante os experimentos, os moluscos foram individualizados em oito caixas de contenção (4 × 4 × 2 cm cada) feitas de acrílico opaco com orifícios de 3mm, onde foram mantidos dentro de um aquário de vidro opaco de 30L de capacidade (35 × 35 × 25cm) com água filtrada da lagoa. Aeradores submersos mantiveram a água circulando. A água foi mantida a uma temperatura controlada de 21°C.

Cada experimento teve a duração de 68 min, com 20 min de período de aclimação e 48 min de período de monitoramento em 48 intervalos de 1 min cada. Todos os valores de cada intervalo do ‘Tempo Estereotipado’ e ‘Tempo em Repouso’ foram usados nos testes estatísticos. ‘Tempo Estereotipado’ é o número total em segundos durante um intervalo em que o animal faz alguma atividade em movimento que não seja se deslocar. ‘Tempo em Repouso’ é o número total de segundos durante um intervalo gasto sem se mover.

2.4 Análises estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o programa R, versão 2.15.0 (R Development Core Team, 2012). O teste de Mann-Whitney *U* foi usado para comparar as diferenças entre o comprimento dos moluscos infectados e não infectados. Este teste não paramétrico foi utilizado devido a não normalidade dos dados.

As análises do comportamento dos moluscos foram conduzidas usando o Modelo Linear Generalizado (MLG) com estimativas através das Equações de Estimação Generalizada (EEG) com suporte do pacote ‘geepack’ e ‘yags’ (HØJSGAARD et al., 2006). Este teste analisou as medidas repetidas da atividade locomotora (Tempo Estereotipado e Tempo em Repouso) dos moluscos infectados e não infectados estimando os parâmetros de regressão e variância em um tempo dependente. Para verificar o padrão da atividade locomotora de cada grupo (infectados e não infectados), as diferenças entre os valores obtidos em cada intervalo gravado durante o período de monitoramento foram analisadas com EEG. Além disso, utilizando as EEG, foi testado se o comprimento dos moluscos infectados e não infectados influenciavam no Tempo Estereotipado e Tempo em Repouso.

O modelo foi feito usando cada parâmetro comportamental como uma variável resposta com erro de distribuição Gaussiana, função de ligação identidade e estrutura de correlação permutável. Como variáveis explicativas foram utilizados o comprimento da

concha e os intervalos de tempo de monitoramento. O modelo mais parcimonioso foi adquirido com base no Critério de Informação de Quase-verossimilhança (CIQ) (PAN, 2001). O nível de significância assumido nos testes estatísticos foi de 5%.

3. RESULTADOS

As análises do EEG do comprimento dos 65 moluscos (15–25 mm, média $18,55 \pm 1,9$) não mostraram qualquer correlação com a atividade locomotora (Tempo Estereotipado, coeficiente estimado = $-0,48 \pm 1,11$, Wald = 0,19 $P = 0,66$; Tempo em Repouso, coeficiente estimado = $0,58 \pm 1,19$, Wald = 0,24, $P = 0,62$).

De todos os moluscos analisados 30 não eliminaram nenhum tipo de cercária e 35 eliminaram somente cercárias de *C. formosanus*. Os moluscos infectados mediam 15–20 mm ($18 \pm 1,3$) de comprimento e os infectados 15–25 mm ($19 \pm 2,3$). O teste de Mann-Whitney U mostrou diferenças significativas do comprimento entre os moluscos infectados e não infectados ($W = 1103$, $P < 0,001$).

A análise da EEG da atividade locomotora revelou diferenças significativas entre os moluscos infectados e não infectados para os parâmetros ‘Tempo Estereotipado’ (coeficiente estimado = $10,50 \pm 4,07$, Wald = 6,66, $P = 0,009$, **Figura 1 A**) e ‘Tempo em Repouso’ (coeficiente estimado = $-10,31 \pm 4,14$, Wald = 6,19, $P = 0,01$, **Figura 1 B**).

As diferenças entre os valores dos 48 intervalos de monitoramento gravados dos moluscos não infectados não foram significativas para os parâmetros ‘Tempo Estereotipado’ (coeficiente estimado = $-0,04 \pm 0,08$, Wald = 0,26, $P = 0,60$) e ‘Tempo em Repouso’ (coeficiente estimado = $0,04 \pm 0,89$, Wald = 0,21, $P = 0,64$). Entretanto, o mesmo teste encontrou diferenças significativas para os moluscos infectados no ‘Tempo Estereotipado’ (coeficiente estimado = $0,10 \pm 0,05$, Wald = 3,91, $P = 0,04$) enquanto que o ‘Tempo em Repouso’ foi considerado como marginalmente significativo (coeficiente estimado = $-0,10 \pm 0,05$, Wald = 3,81, $P = 0,05$) (**Tabela 1**).

Tabela 1. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros comportamentais de *Melanoides tuberculatus* não infectados e infectados naturalmente por *Centrocestus formosanus* a cada intervalo de monitoramento (1 min) durante 48 minutos.

Parâmetros comportamentais	Moluscos não infectados		Moluscos infectados	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
Tempo Estereotipado (seg)	25,2	20,7	17,8	21,1
Tempo em Repouso (seg)	34,3	20,8	41,8	21,1

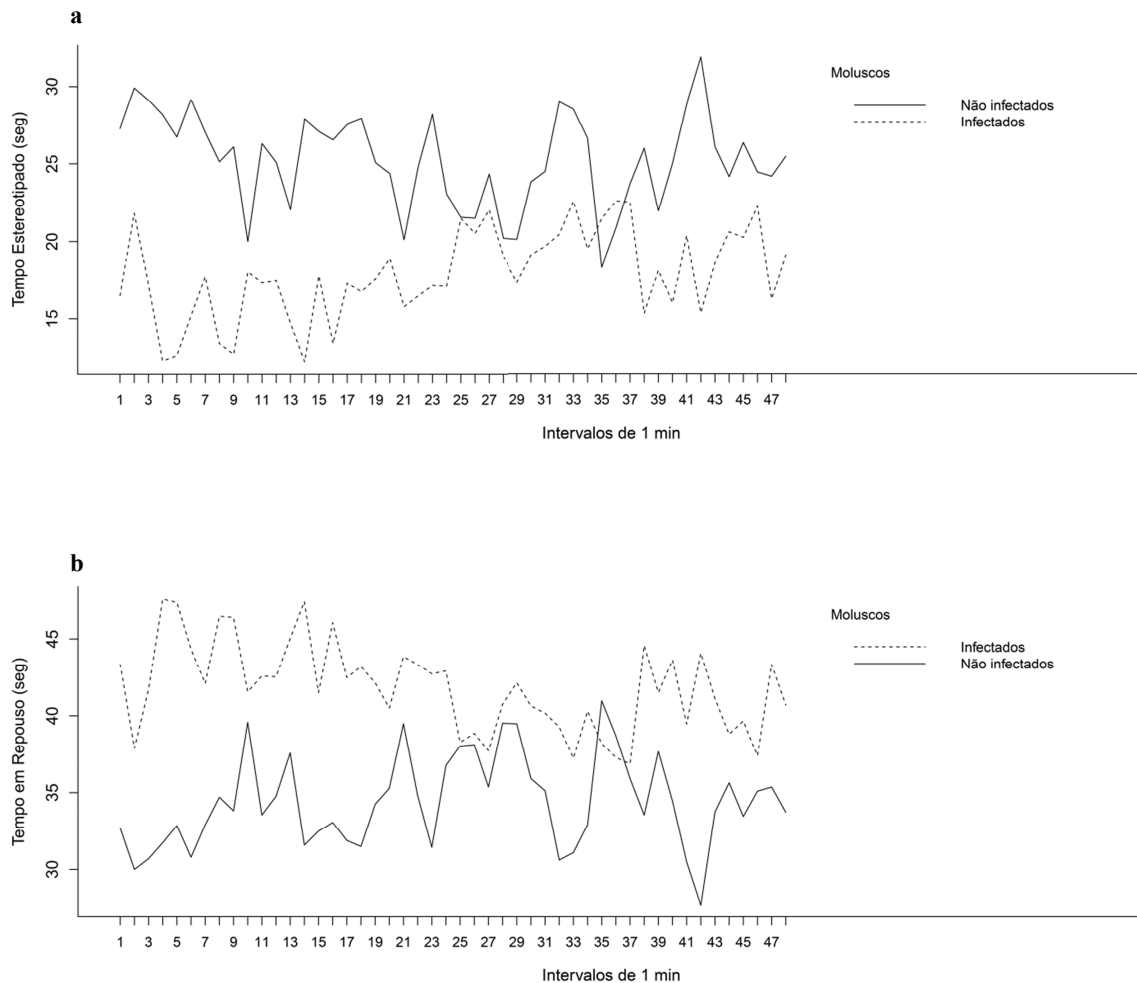


Figura 1. Gráfico comparativo dos intervalos do período de monitoramento do (a) Tempo Estereotipado (segundos) e (b) Tempo em Repouso (segundos) de *Melanoides tuberculatus* não infectados e infectados por *Centrocestus formosanus*.

4. DISCUSSÃO

A relação parasito-hospedeiro é intrigante e envolve, por exemplo, competição por energia e nutrientes, com complexos processos fisiológicos, alterando o metabolismo e a taxa de crescimento dos hospedeiros (PROSBT; KUBE 1999; PINHEIRO et al., 2009; TUNHOLI et al., 2011).

Condições de estresse são referidas em moluscos hospedeiros em decorrência de alterações metabólicas causadas por trematódeos quando estádios intramolusco influenciam a mobilização de cálcio entre a concha e a hemolinfa durante o desenvolvimento da larva (TUNHOLI et al., 2011). Por outro lado, a aceleração da taxa metabólica de energia em moluscos causa um balanço negativo devido ao alto consumo de nutrientes durante o desenvolvimento da larva no hospedeiro (PINHEIRO; AMATO, 1994; PINHEIRO et al., 2009; TUNHOLI et al., 2011). Assim, como consequência de tais efeitos, pode haver alteração do comportamento padrão do molusco hospedeiro.

As diferenças nas dimensões das conchas de moluscos podem ser também influenciadas pelo parasitismo (LEVRI et al. 2005; McCARTHY et al., 2004; ALDA et al., 2010). Neste estudo, *M. tuberculatus* infectados foram significativamente maiores que os não infectados ($P < 0,001$). As comparações do comprimento do molusco com sua atividade

locomotora não foram significativamente correlacionadas. Entretanto, quando comparamos a atividade locomotora dos hospedeiros infectados com não infectados, os primeiros reduziram de modo significativo o ‘Tempo Estereotipado’ e aumentaram o ‘Tempo em Repouso’.

M. tuberculatus infectados com *C. formosanus*, além de apresentarem uma atividade locomotora reduzida, apresentaram um padrão irregular de comportamento, ao contrário dos não infectados que apresentaram um padrão regular durante o período de monitoramento. Este estudo mostra que o parasito *C. formosanus* é capaz de alterar a atividade locomotora de *M. tuberculatus* independente de seu tamanho.

5. CONCLUSÃO

O comportamento locomotor de *M. tuberculatus* não infectados difere dos moluscos infectados com *C. formosanus*, que apresentaram um padrão reduzido e irregular em seus movimentos. Moluscos infectados são maiores que os não infectados, no entanto, as alterações comportamentais independem de seu comprimento. É possível supor que a capacidade de dispersão ativa em moluscos possa ser influenciada pelo parasitismo e que por sua vez podem causar erros de interpretação em dados quantitativos quanto a distribuição das espécies sobre um espaço ou tempo.

6. CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados deste trabalho evidenciaram que os parasitos são capazes de alterar o padrão de atividade locomotora de seus hospedeiros, reduzindo o tempo de locomoção e aumentando o tempo de repouso. Em condições experimentais, *Ascocotyle (Phagicola) pindoramensis* só será capaz de alterar o comportamento de *Poecilia vivipara* após pelo menos 14 dias da infecção, demonstrando que o estágio de maturidade das larvas é um fator importante em estudos comportamentais.

Foi experimentalmente demonstrado que em *P. vivipara* uma maior intensidade de parasitos diminuiu a atividade locomotora do hospedeiro sendo possível supor que no meio ambiente as sucessivas infecções naturais possam vir a produzir um efeito cumulativo tanto na intensidade de parasitos como no comportamento locomotor.

Embora os moluscos infectados por *C. formosanus* tenham apresentado dimensões maiores que os não infectados, o comprimento tanto de *Melanooides tuberculatus* como de *P. vivipara*, não foi considerado um fator preponderante para alterar a atividade locomotora dos hospedeiros intermediários.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREATA, J.V.2012. Ictiofauna da lagoa Rodrigo de Freitas, estado do Rio de Janeiro: composição e aspectos ecológicos. **Oecologia Australis**, 16, (3), 467-500.
- ARIZMENDI, M. A. Description de algunas etapas larvarias y de la fase adulta de *Centrocestus formosanus* de Tezontepec de Aldama, Higoalco. **Anal. Inst. Biol. Univ. Nal. Autón. Méx. Ser. Zool.**, 63, 1-11,1992.
- ALDA, P.; BONEL, N.; CAZZANIGA, N. J.; MARTORELLI, S. R. Effects of parasitism and environment on shell size of the South American intertidal mud mollusk *Heleobia australis* (Gastropoda). **Estuarine Coastal and Shelf Science**, 87, 305–310, 2010.
- BASS, C.S.; WEIZ, J.S. Conspicuous behaviour of *Fundulus heteroclitus* associated with high digenean metacercariae gill abundances. **Journal of Fish Biology**, 74, 763–772. 2009.
- BARBER, I.; HOARE, D.; KRAUSE, J. Effects of parasites on fish behaviour: a review and evolutionary perspective. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, 10,131–165, 2000.
- BARBER, I.; POULIN, R. **Interactions between fish, parasites and disease**. In: P.J.B. Hart, J. D. Reynolds, editors. The Handbook of Fish and Fisheries. Oxford: Blackwell Science, UK. p. 359–389, 2002.
- BORCATO, R. 2011. *Poecilia vivipara*. Disponível em: <<http://img528.imageshack.us/img528/3926/121120111367800x599.jpg>>. Acesso em: 25, jan, 2013.
- CHAI, J.Y.; LEE, S.H. Food-borne intestinal trematode infections in the Republic of Korea. **Parasitology International**, 51,129-154, 2002.
- CORTÉS, D.A.; DOLZ, G.; ZÚÑIGA, J.J.R.; ROCHA, A.E.J.; ALAN, D.L. *Centrocestus formosanus* (Opisthorchiida: Heterophyidae) como causa de muerte de alevines de tilapia gris *Oreochromis niloticus* (Perciforme: Cichlidae) en el Pacífico seco de Costa Rica. **Revista de Biología Tropical**, 58, 4, 1453-1465, 2010.
- CRANE, A. L.; FRITTS, A. K.; MATHIS, A.; LISEK, J. C.; BARNHART, M. C. Do gill parasites influence the foraging and antipredator behaviour of rainbow darters, *Etheostoma caeruleum*? **Animal Behaviour**, 82, 817–823, 2011.
- CROFT, D. P.; EDENBROW, M.; DARDEN, S.K.; RAMNARINE, I.W.; VAN OOSTERHOUT, C.; CABLE, J. Effect of gyrodactylid ectoparasites on host behaviour and social network structure in guppies *Poecilia reticulata*. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, 65, 2219–2227, 2011.
- DAY, J.W.; YÁÑEZ-ARACIBIA, A. Coastal lagoons and estuaries: ecosystem approach. **Ciencia Interamericana**, 22, 11-26, 1982.
- ESCH, G.W.; CURTIS, L.A.; BARGER, N.A. A perspective on the ecology of trematode ecology of trematode communities in snails. **Parasitology**, 123, S57–S75, 2001.

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

FALTÝNKOVÁ, A.; NAŠINCOVÁ, V.; KABLÁSKOVÁ, L. Larval trematodes (Digenea) of planorbide snails (Gastropoda: Pulmonata) in Central Europe: a survey of species and key to their identification. **Systematic Parasitology**, 69, 155–178, 2008.

GÉRARD C.; THÉRON, A. Age/size- and time-specific effects of *Schistosoma mansoni* on energy allocation patterns of its snail host *Biomphalaria glabrata*. *Oecologia* 112:447-452. 1997.

GIOVANELLI, A.; SILVA, C.L.P.A.C.; LEAL, G.B.E.; BAPTISTA, D.F. Habitat preference of freshwater molluscs in relation to environmental factors and the presence of the competitor mollusk *Melanoides tuberculatus* (Müller, 1774). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 100, 169-76, 2005.

HAMMOND-TOOKE, C.A.; NAKAGAWA, S.; POULIN, R. Parasitism and behavioural syndromes in the fish *Gobiomorphus cotidianus*. **Behaviour**, 149, 601–622, 2012.

HALEKOH, U.; HØJSGAARD, S.; YAN, J. The R package geePack for generalized estimating equations. **Journal of Statistical Software**, 15, 2, 1–11, 2006.

HAY, K.B.; FREDENSBORG, B.L.; POULIN, R. Trematode-induced alterations in shell shape of the mud snail *Zeacumantus subcarinatus* (Prosobranchia: Batillariidae). **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, 85, 989-992, 2005.

HØJSGAARD, S.; HALEKOH, U.; YAN, J. The R package geePack for generalized estimating equations. **Journal of Statistical Software**, 15, 2, 1–11, 2006.

IHERING, R.V. 1938. Cyprinodontiformes brasileiros, sistemática e morfologia biológica. **Archivos do Instituto Biológico**, 4, 243-270.

KOLLURU, G. R.; GREEN, Z. S.; VREDEVOE, L. K.; KUZMA, M. R.; RAMADAN, S. N.; ZOSKY, M. R. Parasite infection and sand coarseness increase sand crab (*Emerita analoga*) burrowing time. **Behavioral Process**, 88, 184–191, 2011.

KÜHNE, C. 2011. *Melanoides tuberculatus*. Disponível em: <http://www.uni-mainz.de/eng/Bildergalerie/10_zoology_molluscs_melanoides_tuberculatus_rdax_100x66.jpg>. Acesso em: 25, jan, 2013.

LAFFERTY, K. D.; MORRIS, A.K. Altered Behavior of Parasitized Killifish Increases Susceptibility to Predation by Bird Final Hosts. **Ecology**, 77, 5, 1390-1397, 1996.

LAFFERTY, K.D. The Evolution of Trophic Transmission. **Parasitology Today**, 15, 3, 1999.

LEVRI, E. P.; LUNNEN, S. J.; ITLE, C. T.; MOSQUEA, L.; KINKADE, B. V.; MARTIN, T. G.; DELISSER M. A. Parasite-induced alteration of diurnal rhythms in a freshwater mollusc. **The Journal of Parasitology**, 93, 231–237, 2007.

LEVRI, E. P.; DILLARD, J.; MARTIN, T. Trematode infection correlates with shell shape and defence morphology in a freshwater mollusc. **Parasitology**, 130, 699–708, 2005.

LONG, Z. T.; LEROUX, S. J.; FANINGER T.; LOREAU, M. Interactive effects of nutrient enrichment and the manipulation of intermediate hosts by parasites on infection prevalence and food web structure. **Ecological Modelling**, 228, 1–7, 2012.

MAGALHÃES, D. P.; CUNHA, R. A.; BUSS, D. F.; SANTOS, J. A. A.; BAPTISTA, D. F. Behavioral response of the zebrafish *Danio rerio* to sublethal stress by sodium hypochlorite—evaluation of a method of toxicological essay by real-time biomonitoring in the laboratory. **Ecotoxicology**, 16, 417–422, 2007.

McCARTHY, H. O; FITZPATRICK, S.; IRWIN, S.W.B. A transmissible trematode affects the direction and rhythm of movement in a marine gastropod. **Animal Behaviour**, 59, 1161–1166, 2000.

MEREDITH, R.W; PIRES, M.N.; REZNICK, D.N.; SPRINGER, M.S. Molecular phylogenetic relationships and the evolution of the placenta in *Poecilia* (*Micropoecilia*) (Poeciliidae: Cyprinodontiformes). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 55, 2, 631–639, 2010.

MILLER, A. A.; POULIN, R. Parasitism, movement, and distribution of the mollusk *Diloma subrostrata* (Trochidae) in a soft-sediment intertidal zone. **Canadian Journal Zoology**, 79, 2029–2035, 2001.

O'BRIEN, C. Appreciating the importance of parasites: Analyzing and understanding the ecology of parasite-host interactions. 2008. 134f. Dissertação (Doutor em Filosofia). The University of Arizona.

PAN, W. Akaike's information criterion in generalized estimating equations. **Biometrics**, 57:120–125. 2001.

PINHEIRO, J.; MALDONADO, A.; LANFREDI, Jr. 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**, 10, 55–59, 2009.

PINHEIRO, J.; AMATO, S. B. *Eurytrema coelomaticum* (Digenea: Dicrocoelidae): the effect of infection on carbohydrate contents of its intermediate mollusc host, *Bradybaena similaris* (Gastropoda, Xanthonychidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 89, 3, 407–410, 1994.

PINTO, H. A. **Infecção natural de *Melanoides tuberculatus* (Mollusca: Thiaridae) por *Centrocestus formosanus* (Trematoda: Heterophyidae) e por *Philophthalmus gralli* (Trematoda: Philophthalmidae) no Brasil.** 2009. 99f. Dissertação (Mestre em Parasitologia). Universidade Federal de Minas Gerais. 2009.

POULIN, R. The evolution of parasite manipulation of host behaviour: A theoretical analysis. **Parasitology**, 109, S109–S118, 1994.

POULIN, R. **Parasite manipulation of host behaviour**. In *The Behavioural Ecology of Parasites* (Lewis, E.E., Campbell, J.F., Sukhedo, M.V.K., eds). CAB International, Wallingford, Oxfordshire, pp. 243–257, 2002.

POULIN, R. Parasite Manipulation of Host Behavior: An Update and Frequently Asked Questions. In H. Jane Brockmann, editor: *Advances in the Study of Behavior*, Burlington: Academic Press, 41, 151-186, 2010.

PROBST, S.; KUBE, J. Histopathological effects of larval trematode infections in mud molluscs and their impact on host growth: what causes gigantism in *Hydrobia ventrosa* (Gastropoda: Prosobranchia)? **Journal of Experimental Marine Biology Ecological**, 238, 49–68, 1999.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>, 2011.

RICHARDS, E. L.; VAN OOSTERHOUT C.; CABLE, J. Sex-Specific Differences in Shoaling Affect Parasite Transmission in Guppies. **PLoS ONE** 5, 10, e13285. 2010.

SANTOS, E. O. Peixes de água doce (vida e costumes dos peixes do Brasil). Volume 2, Itatiaia, Belo Horizonte, MG. p. 267, 1958.

SANTOS, C. P.; LOPES, K. C.; COSTA, V. S.; SANTOS, E. G. N. Fish-borne trematodosis: Potential risk of infection by *Ascocotyle (Phagicola) longa* (Heterophyidae). **Veterinary Parasitology**, *in press*, Acesso em: 25, jan, 2013

SANTOS, E. G. N.; CUNHA, R. A.; SANTOS, C. P. Behavioral responses of *Poecilia vivipara* (Osteichthyies: Cyprinodontiformes) to experimental infections of *Acanthocollaritrema umbilicatum* (Digenea: Cryptogonimidae). **Experimental Parasitology**, 127, 522–526, 2011.

SCHOLZ, T.; SALGADO-MALDONADO, G. The introduction and dispersal of *Centrocestus formosanus* (Nishigori, 1924) (Digenea: Heterophyidae) in Mexico: A review. **The American Midland Naturalist**, 143, 1, 185-200, 2000.

SCHOLZ, T.; AGUIRRE-MACEDO, M.L.; SALGADO-MALDONADO, G. Trematodes of the family Heterophyidae (Digenea) in México, a review of species and new host and geographical records. **Journal of Natural History**, 35, 1733-1772, 2001.

SHIRAKASHI, S.; GOATER, C. P. Intensity-dependent alteration of minnow (*Pimephales promelas*) behavior by a brain-encysting trematode. **Journal of Parasitology**, 88, 6, 1071–1074, 2002.

SHIRAKASHI, S.; GOATER, C. P. Chronology of parasite-induced alteration of fish behaviour: effects of parasite maturation and host experience. **Parasitology**, 130, 177-183. 2005.

SIMÕES, S. B. E.; SCHOLZ, T.; BARBOSA, H. S.; SANTOS, C. P. Taxonomic status, redescription, and surface ultrastructure of *Ascocotyle (Phagicola) pindoramensis* n. comb. (Digenea: Heterophyidae). **The Journal of Parasitology**, 92, 3, 501–508, 2006.

SIMÕES, S. B. E.; NEVES, R. F. C.; SANTOS, C. P. Life history of *Acanthocollariotrema umbilicatum* Travassos, Freitas and Bührnheim, 1965 (Digenea: Cryptogonimidae). **Parasitology Research**, 103, 523–528, 2008.

SIMÕES, S. B. E. **Ciclos evolutivos de Opisthorchioidea Looss, 1899 (Trematoda: Digenea) da Lagoa Rodrigo de Freitas, RJ.** 2009a. Tese (Doutorado em Biologia Parasitária). 85f. Instituto Oswaldo Cruz. 2009a.

SIMÕES, S. B. E.; BARBOSA, H. S.; SANTOS, C. P. The life history of *Pygidiopsis macrostomum* Travassos, 1928 (Digenea: Heterophyidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 104, 1, 106–111, 2009b.

SIMÕES, S. B. E.; BARBOSA, H. S.; SANTOS, C. P. The life cycle of *Ascocotyle (Phagicola) longa* (Digenea: Heterophyidae), a causative agente of fish borne trematodosis. **Acta Tropica**, 113, 3, 226–33, 2010.

TELES, H. M. S.; VAZ, J. F.; FONTES, L. R.; DOMINGOS, M. D. Registro de *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Mollusca, Gastropoda) no Brasil: caramujo hospedeiro intermediário da angiostrongilíase. **Revista de Saúde Pública**, 31, 310-312, 1997.

TARABINI, A. 2013. Foto da lagoa Rodrigo de Freitas. Disponível em: <<http://oglobo.globo.com/in/5983154-f20-733/FT712A/1cristo.jpg>>. Acesso em: 25, jan, 2013.

THIMBAULT, R.; SHULTZ, R. J. Reproductive adaptation among viviparous fishes (Cyprinodontiformes: Poeciliidae). **Evolution**, 32, 320-333, 1978.

TUNHOLI, V. M.; LUSTRINO, D.; TUNHOLI-ALVES, V. M.; GARCIA, J. S.; MELLO-SILVA, C. C. C.; MALDONADO, Jr. A.; RODRIGUE, M. L. A.; PINHEIRO, J. Influence of *Echinostoma paraensei* (Lie and Basch, 1967) infection on the calcium content in *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Experimental Parasitology** 129, 266–269, 2011.

VAZ, J. F.; TELES, H. M. S.; CORREA, M. A.; LEITE, S. P. S. Ocorrência no Brasil de *Thiara (Melanoides) tuberculata* (O. F. Müller, 1774) (Gastropoda, Prosobranchia), primeiro hospedeiro intermediário de *Clonorchis sinensis*. **Revista de Saúde Pública**, 20, 318-322, 1986.

VEITENHEIMER-MENDES, I. L. *Corbicula manilensis* (Philippi, 1844) molusco asiático, na bacia do Jacuí e do Guaíba, Rio Grande do Sul, Brasil (Bivalvia, Corbiculidae). **Iheringia, Série Zoológica**, 60, 63-74, 1981.

YÁÑEZ-ARACIBIA, A.; DOMÍNGUEZ, A. L. L.; PAULY, D. Coastal lagoons as fish habitats. p.363-376. In: B. Kjerfve (ed.). Coastal Lagoon Processes. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. p. 577, 1994.

ANEXOS