

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

DISSERTAÇÃO

Avaliação do Perfil Glicídico e da Biologia Reprodutiva de *Biomphalaria glabrata* (Mollusca) Experimentalmente Co-Infetada por *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda) e *Echinostoma paraensei* (Trematoda)

Tatiane Cristina dos Santos Bonfim

2016

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

AVALIAÇÃO DO PERFIL GLICÍDICO E DA BIOLOGIA REPRODUTIVA
DE *Biomphalaria glabrata* (Mollusca) EXPERIMENTALMENTE
CO-INFECTADA POR *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda) E
***Echinostoma paraensei* (Trematoda)**

TATIANE CRISTINA DOS SANTOS BONFIM

Sob a Orientação do Professor

Jairo Pinheiro da Silva

E Co-orientação do Pesquisador

Juberlan Silva Garcia

Dissertação submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**
Veterinárias, no curso de Pós-graduação em
Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2016

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

TATIANE CRISTINA DOS SANTOS BONFIM

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 25/02/2016.

Prof. Dr. Jairo Pinheiro da Silva, UFRRJ
(Orientador)

Prof^a. Dra. Solange Viana Paschoal Blanco Brandolini, UFRRJ
(Titular)

Dra. Ester Maria Mota, IOC/FIOCRUZ
(Titular)

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida, saúde, força e sabedoria para realizar essa caminhada.

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

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

Ao meu noivo, Carlos Henrique, pelo incentivo e paciência, pelas palavras de carinho e apoio, por tentar entender a bioquímica pra me ajudar, por me ajudar a finalizar mais essa etapa e por tudo o que vivemos.

Ao meu orientador Jairo Pinheiro, Área de Biofísica, Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto de Biologia, UFRRJ pelos ensinamentos e confiança depositada em mim e no meu trabalho.

Aos amigos Florence, Mariana, Fabíola, Vinicius, Victor e Fabricio pelas conversas, ensinamentos, ajuda e companhia.

Ao meu co-orientador Dr. Juberlan Garcia do Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios do Instituto Oswaldo Cruz, IOC, Fiocruz pela confiança e ajuda.

À toda equipe do Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios do Instituto Oswaldo Cruz, IOC, Fiocruz, pelos conselhos e ajuda na realização dos experimentos.

À Dra. Ester Mota do Laboratório de Patologia do Instituto Oswaldo Cruz, IOC, Fiocruz, pela ajuda na realização dos experimentos.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, CPGCV/UFRRJ, pelos ensinamentos.

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

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos ao longo da realização deste Curso.

BIOGRAFIA

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

Concluiu o ensino fundamental na Escola Municipal Presidente Eurico Dutra, RJ. Em 2006 ingressou na Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio, Fiocruz, RJ concluindo em 2008 o Ensino Médio Integrado ao Técnico de Laboratório de Bodiagnóstico em Saúde.

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

Graduou-se em Licenciatura em Ciências Biológicas em novembro de 2013. Em março de 2014, ingressou no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – nível mestrado.

RESUMO

A interação entre hospedeiros intermediários e helmintos pode causar alterações metabólicas e reprodutivas no molusco hospedeiro, que começam a usar suas reservas para manter as funções vitais, na elaboração de resposta imunológica e reparação de danos teciduais e também para compensar a drenagem de nutrientes/energia pelos parasitos em desenvolvimento. Investigações sobre as co-infecções por helmintos de espécies diferentes podem fornecer informações essenciais sobre a biologia da sua co-existência, refletindo aspectos mais próximos àqueles que encontramos em condições naturais. Nossos objetivos foram investigar as alterações reprodutivas, avaliar a atividade da lactato desidrogenase e as concentrações de glicose na hemolinfa e glicogênio no complexo glândula digestiva-gônada e massa cefalopediosa, e também verificar alterações histológicas e histoquímicas de *Biomphalaria glabrata* experimentalmente co-infectados com *Echinostoma paraensei* e *Angiostrongylus cantonensis*. Cinco grupos de moluscos (não infectados, com infecções simples (*Echinostoma paraensei* ou *Angiostrongylus cantonensis*) e dupla, seja *E. paraensei* primeiro (E + A) ou *A. cantonensis* primeiro (A + E)) foram acompanhados; três vezes por semana durante quatro semanas o número de massas de ovos, número de ovos e número de moluscos eclodidos foram contados. Amostras para a análise histológica e histoquímica do ovoteste, glândula do albúmen, complexo glândula digestiva e massa cefalopediosa foram coletadas após quatro semanas, assim como amostras para a análise bioquímica. O número de massas de ovos/molusco, ovos/molusco e moluscos eclodidos dos moluscos infectados apresentaram diferenças significativas quando comparados com o grupo controle, especialmente no grupo E + A, cuja a maioria dos valores dos parâmetros analisados foi inferior a 50% dos valores observados para os moluscos controle. Um decréscimo significativo nos níveis de glicose e de glicogênio, em contraste com um aumento de atividade da lactato desidrogenase foi observado nos exemplares infectados. Estes resultados indicam que a demanda de energia intensa leva o molusco infectado ao aumento da degradação anaeróbia de carboidratos para obtenção de energia em uma taxa compatível com o aumento da demanda energética, numa tentativa de manter a homeostase glicêmica. As análises histológicas e histoquímicas mostraram que a presença de ambos os parasitos nos órgãos analisados associados com intensa desorganização celular.

Palavras-Chave: *Biomphalaria glabrata*, *Angiostrongylus cantonensis*, *Echinostoma paraensei*, co-infecção, análise reprodutiva, análise bioquímica, relação parasito-hospedeiro.

ABSTRACT

The interaction between intermediate hosts and helminths can cause metabolic and reproductive changes in the host snail, they start using their reserves to maintain its vital functions, immune system activation, repair of tissue damage and also to supply the necessary energy for the parasites development. Investigations of co-infection by different helminths can provide essential information about the biology of their co-existence. Our aims are investigate the reproductive changes, evaluate the activity of lactate dehydrogenase and the concentrations of glucose in the hemolymph and glycogen in the digestive gland complex and cephalopedal mass, and also verify histological and histochemical changes of *Biomphalaria glabrata* experimentally co-infected with *Echinostoma paraensei* and *Angiostrongylus cantonensis*. Five groups of snails i.e. uninfected, with single and double infections, either *E. paraensei* first (E+A) or *A. cantonensis* first (A+E) were followed; three times a week during four weeks the numbers of egg masses, eggs and hatched snails were counted. Histological and histochemical samples of the ovotestis, albumen gland, digestive gland complex and cephalopedal mass was collected after four weeks as well samples for the biochemical analysis. The number of egg masses/snail, eggs/snail and hatched snails showed significative differences comparing the control group to all infected groups, especially in group E + A, with the majority of values of parameters analyzed lower than 50% of those observed for control snails. A significant decrease in glucose levels and glycogen content, in contrast an increase of lactate dehydrogenase activity was observed in the infected snails. These results indicate intense energy demand that takes the snail increasing the anaerobic degradation of carbohydrates in the infected snails to obtain energy in an attempt to maintain homeostasis. The histological analysis showed that presence of both parasites in the all organs analysed and the parasites were associated with cell disorganization.

Key-words: *Biomphalaria glabrata*, *Angiostrongylus cantonensis*, *Echinostoma paraensei*, co-infecção, reproductive analysis, biochemical analysis, host-parasite relationship.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Concha de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). 4
- Figura 2:** Aspectos anatômicos de *Biomphalaria glabrata*. 5
- Figura 3:** Ciclo biológico de *Echinostoma* spp. 8
- Figura 4:** Ciclo biológico do nematoide *Angiostrongylus cantonensis*. 11
- Figura 5:** Mapa de distribuição do *Angiostrongylus cantonensis* e casos de angiostrongilíase neural no Brasil. 14
- Figura 6:** Cortes histológicos de diferentes órgãos de *Biomphalaria glabrata* experimentalmente co-infectada por *Echinostoma paraensei* e *Angiostrongylus cantonensis* corados com HE 29
- Figura 7:** Corte histológico do ovoteste de *Biomphalaria glabrata* experimentalmente co-infectada por *Echinostoma paraensei* e *Angiostrongylus cantonensis* corado com hematoxilina-eosina. 30
- Figura 8:** Corte histológico da glândula de albumem de *Biomphalaria glabrata* experimentalmente co-infectada por *Echinostoma paraensei* e *Angiostrongylus cantonensis* corado com hematoxilina-eosina. 31
- Figura 9:** Corte histológico da glândula de digestiva de *Biomphalaria glabrata* experimentalmente co-infectada por *Echinostoma paraensei* e *Angiostrongylus cantonensis* corado com PAS para observação de glicogênio. 32
- Figura 10:** Corte histológico da massa cefalopediosa de *Biomphalaria glabrata* experimentalmente co-infectada por *Echinostoma paraensei* e *Angiostrongylus cantonensis* corado com PAS para observação de glicogênio. 33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Efeitos da reprodução e mortalidade de *Biomphalaria glabrata* co-infectada com *Angiostrongylus cantonensis* e *Echinostoma paraensei*. 26

Tabela 2: Influência da co-infecção com *Angiostrongylus cantonensis* e *Echinostoma paraensei* sobre o metabolismo de carboidratos de *Biomphalaria glabrata*. 27

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Parasitismo	3
2.2 O molusco <i>Biomphalaria glabrata</i>	3
2.2.1 Classificação taxonômica e características morfológicas	3
2.2.2 Importância médica-veterinária	6
2.3 <i>Echinostoma paraensei</i>	6
2.3.1 Classificação taxonômica e características morfológicas	6
2.3.2 Ciclo Biológico	7
2.2.3 Equinostomíase	9
2.4 <i>Angiostrongylus cantonensis</i>	9
2.4.1 Classificação taxonômica e características morfológicas	9
2.4.2 Ciclo Biológico	11
2.4.3 Angiostrongilíase neural	13
2.5 Importância do filo Mollusca no desenvolvimento de estágios larvais de trematódeos e nematóides	15
2.5.1 Relação molusco x nematoíde	16
2.5.2 Relação molusco x trematódeo	17
2.6 Parâmetros fisiológicos	18
2.6.1 Alterações reprodutivas em moluscos infectados	18
2.6.2 Alterações glicídicas em moluscos infectados	19
3. OBJETIVOS	21
3.1 Objetivo geral	21
3.2 Objetivos específicos	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1 Obtenção das formas infectantes	22

4.2	Infecção experimental e formação de grupos	22
4.3	Análises de biologia reprodutiva	23
4.4	Análises bioquímicas	24
4.4.1	Análise da concentração de glicose	24
4.4.2	Análise da atividade da lactato desidrogenase	24
4.4.3	Análise da concentração de glicogênio	24
4.5	Análise histológica e histoquímica	25
4.6	Análises estatísticas	25
5.	RESULTADOS	26
6.	DISCUSSÃO	34
7.	CONCLUSÕES	39
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
9.	ANEXOS	51

1. INTRODUÇÃO

Biomphalaria glabrata (Say, 1818) é um planorbídeo que apresenta importância médica e veterinária, encontra-se amplamente distribuído no Brasil, sendo encontrado em 16 estados brasileiros (CARVALHO et al., 2005). Além disso, esse molusco é reconhecido como o principal hospedeiro das formas infectantes ao hospedeiro definitivo do *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 no Brasil (GIOVANELLI et al., 2001, TUNHOLI et al., 2011), sendo, ainda, capaz de participar sob condições naturais e experimentais dos ciclos biológicos de *Echinostoma paraensei* Lie & Basch, 1967 e *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) (MALDONADO et al., 2001, EL-SHAZLY et al., 2002, BONFIM et al., 2014).

Wisnivesk (2003) sugere que se avalie o papel do parasitismo na dinâmica da população da espécie hospedeira, enfatizando a necessidade de estudar tanto a população do hospedeiro como a população dos parasitos, uma vez que as infecções parasitárias são fatores que influenciam a dinâmica da população dos hospedeiros, não apenas diretamente afetando os parâmetros reprodutivos e de sobrevivência da espécie, mas também diminuindo a habilidade de competição ou aumentando a vulnerabilidade para os predadores, além de atuar nas interações intra e interespecíficas dos parasitos co-ocorrentes.

O nematoide *Angiostrongylus cantonensis* foi observado parasitando artérias pulmonares de ratos em Canton, China. Em 1945, esse parasito foi incriminado como agente etiológico da meningoencefalite eosinofílica (NOMURA; LIN, 1945). Atualmente utilizamos o termo angiostrongilíase neural devido ao amplo espectro de sinais neurológicos associados à infecção por *A. cantonensis* (HUNG; CHENG, 1988).

Echinostoma paraensei é uma espécie brasileira de trematódeo que foi descrita após serem encontrados exemplares de *B. glabrata* naturalmente infectados, posteriormente o roedor silvestre *Nectomys squamipes* Brants, 1827 foi assinalado como seu hospedeiro natural definitivo (MALDONADO et al. 2001 a, b).

De acordo com Marcogliese (2004), os parasitos podem afetar a biologia dos seus hospedeiros de diversas formas, podendo atuar sobre o comportamento, a fisiologia, a morfologia ou reprodução. Pois ao alcançar o molusco hospedeiro, os helmintos conquistam um novo nicho ecológico, constituído principalmente pela hemolinfa do

molusco. Nesse ambiente, o parasito pode competir por nutrientes para completar o seu desenvolvimento e, além disso, liberar seus produtos de excreção/secreção, gerando alterações no organismo do hospedeiro.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Parasitismo

A diversidade de seres vivos existentes em nosso planeta proporciona a existência de várias formas de interações entre estes seres e destes com o ambiente onde se inserem. Dentre as interações existentes, o parasitismo é uma delas e apresenta uma definição complexa e amplamente discutida.

Infecções parasitárias são fatores que influenciam a dinâmica da população dos hospedeiros, afetando os parâmetros reprodutivos e de sobrevivência da espécie, e também diminuindo a habilidade de competição ou aumentando a vulnerabilidade para os predadores, além de atuar nas interações intra e interespecíficas dos parasitos co-ocorrentes (WISNIVESKY, 2003).

Diferentes autores têm sugerido que alguns trematódeos podem, direta ou indiretamente, agir antagonizando ou beneficiando outras espécies (SUHARDONO et al., 2006; LIE et al., 1977; LIE, 1982).

O estudo da co-infecção com diferentes parasitos pode ser uma estratégia útil para entender melhor a relação parasito-hospedeiro e parasito-parasito e as possíveis alterações morfofisiológicas provocadas (PEREIRA et al., 2006).

Parasitos podem afetar a biologia dos seus hospedeiros de diversas formas, por exemplo, agindo sobre o comportamento, a fisiologia, a morfologia ou reprodução (MARCOGLIESE, 2004).

2.2 O molusco *Biomphalaria glabrata*

2.2.1 Classificação taxonômica e características morfológicas

Entre as classes pertencentes ao filo Mollusca, duas delas merecem destaque pela sua importância médica, veterinária e econômica: as Classes Gastropoda e Bivalvia. A primeira é formada por cerca de $\frac{3}{4}$ do número de espécies do filo e inclui transmissores de helmintos e de pragas de diferentes cultivos. A segunda contém a maioria de moluscos utilizados na alimentação humana e espécies que causam prejuízos econômicos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

Tradicionalmente, a classe Gastropoda é dividida nas subclasses Prosobranchia, Opisthobranchia e Pulmonata. As características gerais da classe Pulmonata são a presença de concha externa ou interna, podendo estar reduzida ou mesmo ausente; presença de tecido ricamente vascularizado; a maioria dos espécimes é hermafrodita. A classe Pulmonata é dividida em três ordens: Stylommatophora; Systellommatophora e Basommatophora.

As principais famílias de importância médica e veterinária pertencem à Ordem Basommatophora, sendo esta formada por moluscos com concha lisa e não operculados; aquáticos, a maioria dulcícola; com um par de tentáculos; os olhos são localizados na base e são hermafroditas com aberturas sexuais distintas.

A família Planorbidae apresenta como características gerais a presença de tentáculos longos e filiformes; aberturas genitais à esquerda e a concha, geralmente, é planispiral. Dentre os diferentes gêneros, o gênero *Biomphalaria* Preston, 1910 apresenta concha planispiral, cujo diâmetro varia entre 7-40 mm nos adultos, a cor natural da concha é amarelo-palha porém pode variar de acordo com as substâncias dissolvidas na água.

No Brasil existem dez espécies e uma subespécie descritas no gênero *Biomphalaria*: *B. glabrata* (Say, 1818); *B. tenagophila* (Orbigny, 1835); *B. straminea* (Dunker, 1848); *B. amazônica* Paraense, 1966; *B. peregrina* (Orbigny, 1835); *B. intermedia* (Paraense; Deslandes, 1962); *B. kuhniiana* (Clessin, 1883); *B. schrammi* (Crosse, 1864); *B. oligoza* Paraense, 1975; *B. occidentalis* Paraense, 1981; *B. tenagophila guaibensis* Paraense, 1984 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

A espécie *B. glabrata* apresenta exemplares adultos com 20 – 40 mm de diâmetro de concha; 5 – 8 mm de largura e cerca de 6 – 7 giros; as paredes laterais dos giros são arredondadas (Figura 1). Sendo a presença de uma crista pigmentada sobre o tubo renal e o sistema reprodutor com bolsa vaginal bem definida, os caracteres para diagnóstico anatômico da espécie (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).



Figura 1: Concha de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). Fonte: Silva, 2014.

Anatomicamente, a massa cefalopediosa, exposta quando o molusco se locomove, é ligada à massa visceral que é permanentemente protegida pela concha (Figura 2).

Apesar de serem hermafroditas, a fecundação cruzada predomina sobre a autofecundação, que ocorre somente quando estão isolados (PARAENSE, 1975). O sistema genital é composto por órgãos genitais masculinos e femininos, tendo como órgãos hermafroditas, o ovoteste, glândula produtora de óvulos e espermatozóides e ovispermiduto (canal para passagem dos gametas). Com cerca de 30 dias os moluscos podem alcançar a maturidade e começam a ovipor, podendo um só indivíduo produzir em poucos meses milhares de descendentes (SOUZA; LIMA, 1997).

A respiração é feita através do saco pulmonar, pseudobrânquias e tegumento. O coração constituído por um átrio e um ventrículo, está contido no pericárdio. O principal órgão de excreção é o rim. O sistema nervoso central é formado por pares de gânglios bucais, cerebrais, pleurais, pedais, parietais e um gânglio visceral, que formam um anel em torno do esôfago. O sistema digestório é completo, compreende a massa bucal, glândulas salivares, esôfago, estômago, glândula digestiva, intestino e ânus (PARAENSE, 1975).

A glândula digestiva contém vários túbulos terminados em fundo cego, revestidos por epitélio colunar, cujas células são altas e apresentam microvilosidades na região apical. Este órgão atua como principal produtor de enzimas digestivas, na absorção e armazenamento de nutrientes e excreção.

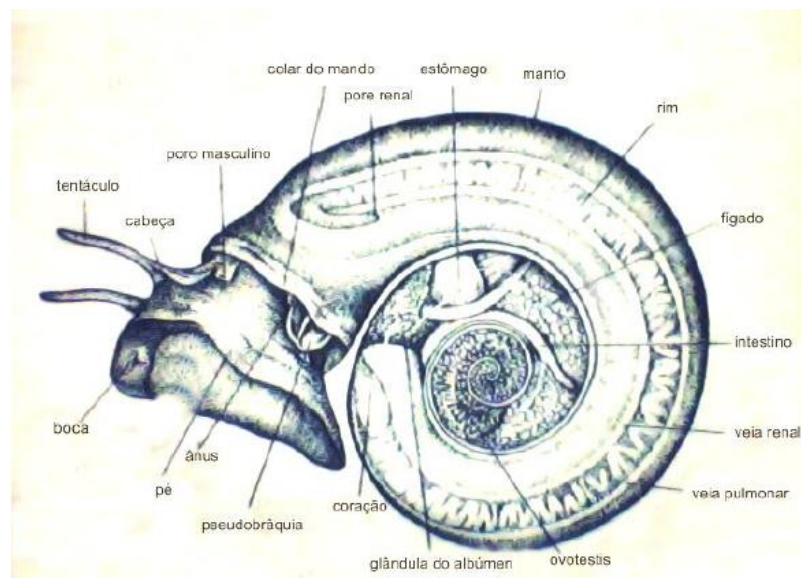


Figura 2: Esquema ilustrativo de *Biomphalaria* com a concha removida, lado esquerdo.

Fonte: modificado de Paraense, 1975.

2.2.2 Importância médica-veterinária

Gastrópodes apresentam importância na medicina humana e veterinária, atuando como hospedeiros intermediários de vários parasitos, tais como trematódeos e nematóides. Entre as diferentes espécies, *B. glabrata* recebe particular atenção por atuar como o principal hospedeiro na transmissão do *Schistosoma mansoni* (WHO, 2011).

Atualmente, esta espécie de molusco tem sido utilizada experimentalmente como hospedeiro intermediário do ciclo de vida do nematoide *A. cantonensis*. el-Shazly et al (2002) verificaram pela primeira vez a presença de *B. glabrata* naturalmente infectada por *A. cantonensis* no Egito. No Brasil ainda não existem registros de infecção natural.

Além disso, esse molusco participa do ciclo biológico de *E. paraensei* como hospedeiro intermediário natural (TOLEDO et al., 2006).

A excelente capacidade de adaptação desta espécie de molusco em regiões tropicais, como o Brasil (PARAENSE, 1975) mostra a possibilidade de disseminação desses helmintos e das doenças que eles causam aos seres humanos e animais (MOSTAFA, 2007; MELLO-SILVA et al., 2010).

A facilidade de manutenção em laboratório, o rápido crescimento e a quantidade de trabalhos publicados, principalmente com trematódeos, fazem com que modelos experimentais utilizando *B. glabrata* sejam bastante apreciados por pesquisadores.

Em um estudo realizado por Morley (2010) é verificado que muitas espécies de nematóides terrestres têm a capacidade de usar moluscos aquáticos como hospedeiros sob condições naturais, e esta capacidade está intimamente relacionada com a alta compatibilidade fisiológica entre parasito e hospedeiro.

2.3 *Echinostoma paraensei*

2.3.1 Classificação taxonômica e características morfológicas

Parasitos da família Echinostomatidae Looss, 1899 constituem cerca de 50 gêneros com 355 espécies descritas e seis subespécies, correspondendo a maior família dentro da classe Trematoda. Os membros desta família são trematódeos intestinais parasitos que podem infectar uma ampla variedade de vertebrados, incluindo humanos, na sua fase adulta

cujo ciclo biológico envolve três categorias de hospedeiros (definitivo, primeiro e segundo hospedeiros intermediários), nos quais sete estágios diferentes (adultos, ovos, miracídios, esporocistos, rédias, cercárias, e metacercárias) irão se desenvolver (TOLEDO et al., 2014).

Além disso, os helmintos adultos pertencentes à família Echinostomatidae são morfologicamente caracterizados pela presença de um colar cefálico guarnecido por espinhos ao redor da ventosa oral. O número e a disposição dos espinhos são considerados caracteres empregados na classificação taxonômica, eles podem estar organizados em uma ou duas fileiras circulares e o número é constante para cada espécie (TOLEDO et al., 2014).

As ventosas oral e ventral estão próximas uma da outra, o tegumento é revestido por escamas. Os dois testículos, geralmente em conjunto, são posteriores ao ovário (TOLEDO; FRIED, 2014).

O gênero *Echinostoma* tem como espécie tipo *Echinostoma revolutum*, (Froelich, 1802) Looss, 1899. *E. paraensei* foi descrito a partir de amostras de *B. glabrata* naturalmente infectadas, posteriormente o roedor *N. squamipes* foi identificado como hospedeiro definitivo natural (MALDONADO et al., 2001a). Os helmintos adultos de *E. paraensei* apresentam colar cefálico composto por 37 espinhos, sendo assim essa espécie pertence ao grupo *revolutum*.

2.3.2 Ciclo Biológico

O ciclo biológico do *E. paraensei* é heteroxeno, necessitando de dois hospedeiros intermediários e um hospedeiro definitivo (Figura 3).

Ao ingerir os moluscos infectados contendo metacercárias de *E. paraensei*, os movimentos peristálticos do hospedeiro intermediário levam as formas infectantes ao estômago, onde o ambiente ácido gera o estímulo necessário para o excistamento. Após passarem pelo estômago, as metacercárias alcançam o intestino delgado, onde se alojam e atingem a maturidade sexual, caracterizando o estágio adulto.

Dos ovos mantidos em água desclorada a 28°C, começam a eclodir os miracídios após 11 dias de incubação. A eclosão ocorre preferencialmente pela manhã e é estimulada pela luz. Os miracídios possuem fototropismo positivo e penetram ativamente nas partes moles do primeiro hospedeiro intermediário. A penetração completa ocorre em cerca de 30 minutos.

O desenvolvimento em esporocisto geralmente ocorre na cavidade pericárdica, podendo também ocorrer ao redor da aorta ou nos tecidos próximos à cavidade pulmonar. As primeiras rédias são observadas a partir do sexto dia de infecção. Elas são liberadas do interior dos esporocistos e migram para vários tecidos do molusco, tendo preferência pelo ovoteste e glândula digestiva (LIE; BASCH, 1967).

Cercárias emergem do interior das rédias a partir do 25º dia de infecção e apresentam fototropismo negativo, nadam ativamente e apresentam uma expectativa de vida em torno de seis horas até encontrar o segundo hospedeiro intermediário (outros moluscos ou anfíbios). A cercária atinge a cavidade pericárdica do molusco através do ureter, rins (ducto ciliado renopericárdico). Seu encistamento pode ocorrer em moluscos do gênero *Biomphalaria*, *Physa* e *Lymnaea* (MALDONADO et al., 2001a).

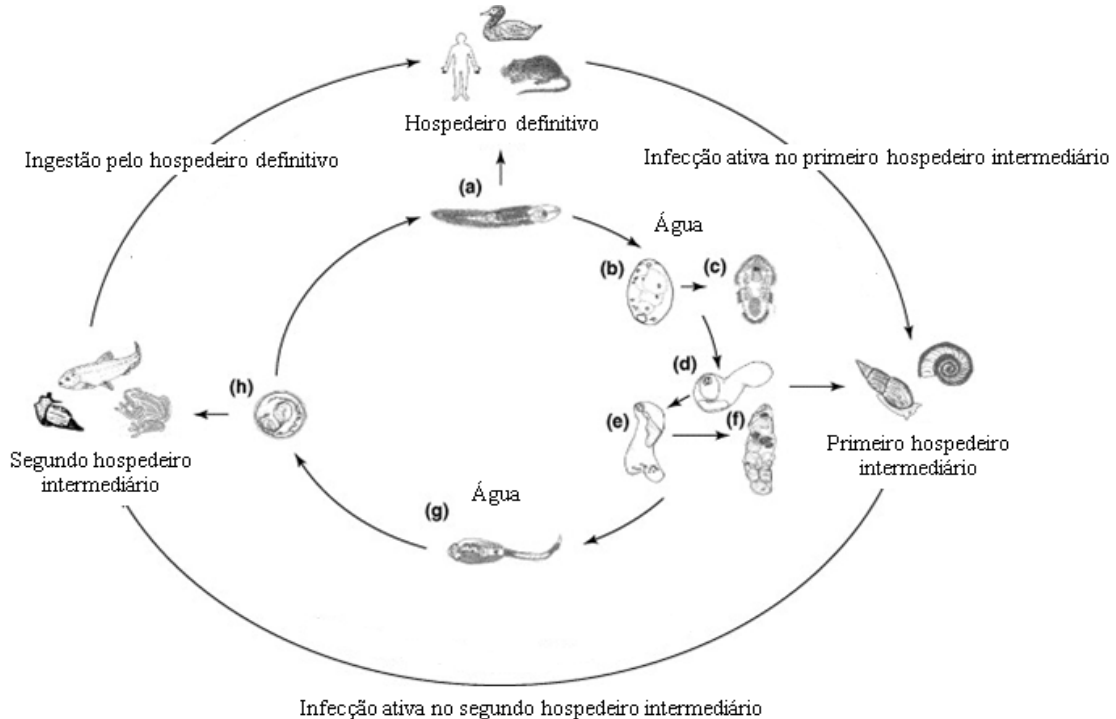


Figura 3: Ciclo biológico de *Echinostoma* spp. a) O helminto adulto habita o intestino delgado dos hospedeiros vertebrados, incluindo humanos; b) ovos são eliminados nas fezes dos hospedeiros; c) o miracídio eclode na água e infecta ativamente os moluscos; d) esporocisto; e) rédia mãe e f) redia filha são estágios de desenvolvimento intramolusco; g) cercárias são eliminadas e infectam o segundo hospedeiro intermediário, se encistando em h) metacercárias que serão ingeridas pelo hospedeiro definitivo, se desencistam e desenvolvem-se em adultos. Fonte: Adaptado de TOLEDO; FRIED, 2005.

Esses parasitos têm sido exaustivamente estudados por apresentarem ampla distribuição geográfica; podem ser encontrados infectando uma grande variedade de aves, mamíferos selvagens e domésticos, incluindo humanos; muitos são hematófagos e infectam a maioria dos órgãos e sítios da cavidade abdominal; adultos e larvas constituem bons materiais para estudo e podem ser mantidos facilmente em laboratório e com baixo custo (KANEV, 2000).

2.3.3 Equinostomíase

A equinostomíase humana ocorre, geralmente, em áreas onde os hospedeiros intermediários compartilham o habitat e sob condições climáticas favoráveis para a dinâmica de transmissão do parasito. Atualmente estima-se que cerca de vinte espécies de equinostomatídeos estejam relacionados com a equinostomíase humana (CHAI, 2009).

De acordo com Toledo e Fried (2014), a maioria das infecções humanas tem sido reportada em países do Leste e Sudeste Asiático embora casos autóctones venham sendo registrados. O crescimento populacional, poluição, pobreza e falta de saneamento básico tem contribuído para o aumento das taxas de infecção em diversas áreas. Contudo, os avanços sociais e econômicos, associados às campanhas de educação em saúde e a utilização de medicamentos em massa à base de praziquantel e albendazol, tem favorecido a redução da prevalência em outros ambientes (TOLEDO; FRIED, 2014).

Infecções humanas com equinóstomas foram demonstrados no Brasil, no período pré-colombiano. Estudos de paleoparasitologia demonstraram a presença de ovos de *Echinostoma* em coprólitos de um corpo humano mumificado no Brasil datado de 560 ± 40 anos atrás, que mostraram semelhanças com *E. paraensei* e *E. luisreyi* (Maldonado et al., 2003) (SIANTO et al, 2005; LELES et al, 2014).

2.4 *Angiostrongylus cantonensis*

2.4.1 Classificação taxonômica e características morfológicas

Angiostrongylus cantonensis é um nematoide (filo Nematoda) da superfamília Metastrongyloidea e família Angiostrongylidae. A sistemática de Angiostrongylidae não é

bem compreendida, muitas espécies foram descritas de forma inadequada. Essa espécie de nematoide foi descrita pela primeira vez por Chen em 1935 a partir de ratos na China e alocado no gênero *Pulmonema*, sendo a espécie identificada como *Pulmonema cantonensis* (WANG et al., 2008).

Outra descrição para a mesma espécie foi realizada por Yokogawa (1937), que não percebeu que se tratava da mesma espécie descrita por Chen e a denominou de *Haemostrongylus ratti*.

Posteriormente, *Pulmonema* se tornou sinonímia de *Angiostrongylus* e *H. ratti* foi sinonimizado com *A. cantonensis*. Essas modificações foram amplamente aceitas e utilizadas (COWIE, 2013). No entanto, Ubelaker (1986) dividiu o gênero *Angiostrongylus* em cinco gêneros com base em caracteres anatômicos mas também considerando os hospedeiros definitivos, de forma que *Angiostrongylus* seriam encontrados em carnívoros, *Parastrongylus* em Murídeos, *Angiocaulus* em Mustelídeos, *Gallegostrongylus* em Gerbils e Murídeos e *Stefanskostrongylus* em Insetívoros. Por ser um parasito de ratos, *A. cantonensis* foi transferido para o gênero *Parastrongylus*, se tornando *Parastrongylus cantonensis*. No entanto, essa classificação não tem sido amplamente adotada sendo essa espécie comumente denominada de *A. cantonensis*.

Existem cerca de 20 espécies do gênero *Angiostrongylus*, duas delas causam doença em seres humanos: *Angiostrongylus costaricensis* Morera & Céspedes, 1971, agente etiológico da angiostrongilíase abdominal, que consistem em um problema principalmente na América Central e América do Sul e *A. cantonensis* (CHEN, 1935), que causa a angiostrongilíase neural e está se disseminando rapidamente pelo mundo (COWIE, 2013).

Os vermes adultos de *A. cantonensis* caracterizam-se por apresentar corpo filiforme afilado na extremidade anterior. As fêmeas são maiores e mais robustas que os machos. A vesícula cefálica está ausente, a abertura oral é simples, circular e cercada por seis papilas (duas dorsais, duas laterais e duas ventrais). O esôfago é claviforme e o poro excretor é posterior ao esôfago. O anel do nervoso é anterior ao meio do esôfago, a bolsa copulatória do macho é pequena e ligeiramente assimétrica. O raio dorsal é grosso, bifurcado em três ramos, com raios externo dorsais digitiformes separados na base. O gubernaculo é conspícuo e curvado. Os túbulos uterinos espirais em torno do intestino cheio de sangue,

são facilmente vistos através da transparência da cutícula. A cauda é longa e arredondada sem expansão cuticular e papilas (THIENGO et al., 2010).

2.4.2 Ciclo biológico

O seu ciclo biológico deste parasito é heteróximo (Figura 4). *Rattus rattus* Linnaeus, 1758 e *Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769 são considerados os hospedeiros definitivos mais comuns, porém outras espécies de roedores são reportados como hospedeiros definitivos (WANG et al., 2008). Muitas espécies de moluscos aquáticos e terrestres são susceptíveis e capazes de transmitir *A. cantonensis*, atuando como hospedeiros intermediários (WANG et al., 2008).

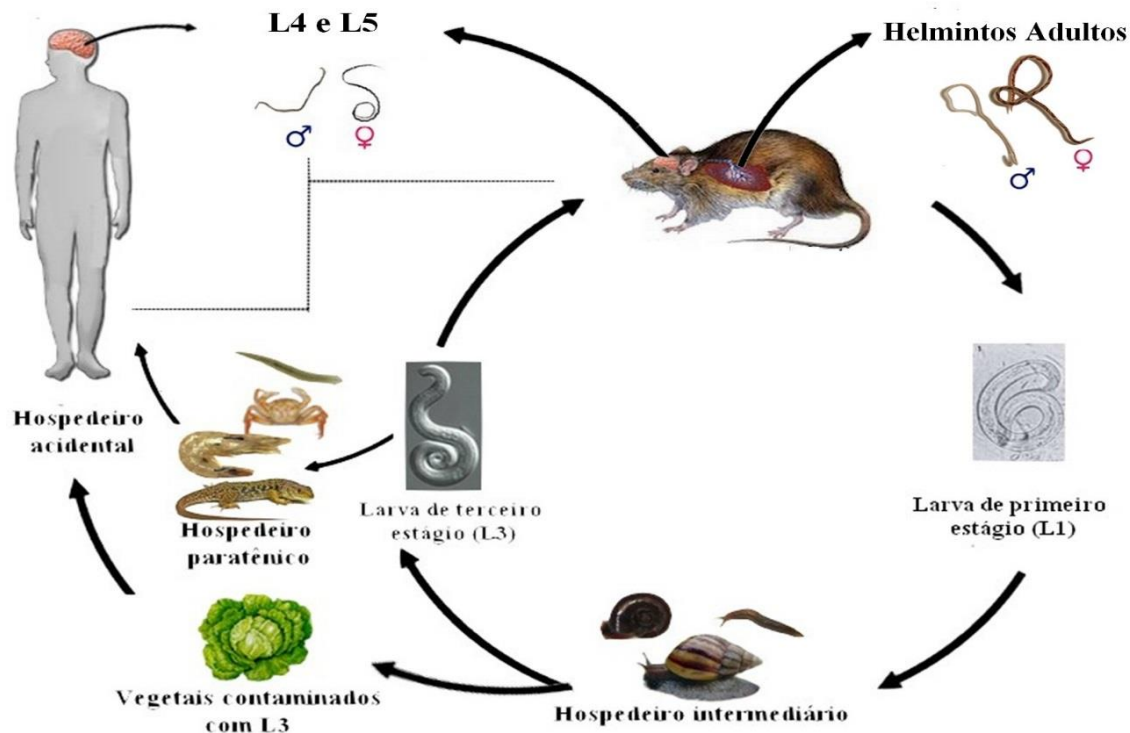


Figura 4: Ciclo biológico do nematoide *Angiostrongylus cantonensis*. Adaptado de WANG et al., 2008.

Estudos têm demonstrado o envolvimento de diferentes espécies de moluscos como hospedeiros deste helminto, sendo o molusco africano, *Achatina fulica* Férussac, 1821 associado a expansão dessa endemia. Dentre estes, a participação de espécies terrestres e aquáticas é registrada, apontando para a grande plasticidade do parasito, fator este que

favorece diretamente o processo de disseminação da angiostrongilíase neural (CALDEIRA et al. 2007, HARRIS; CHENG, 1975)

Os roedores frequentemente se infectam sob condições naturais a partir da ingestão das larvas L₃ encistadas no hospedeiro intermediário. A larva penetra na corrente sanguínea e alcança o sistema nervoso central (SNC), onde realizam duas mudas (L₃ – L₄ – L₅), se tornando jovens adultos em aproximadamente 40 dias. Os jovens adultos migram para as artérias pulmonares onde amadurecem sexualmente passando a serem considerados adultos. Os ovos são direcionados para os capilares pulmonares onde em seguida, ocorre a eclosão da larva L₁ que migra ascendentemente pelos bronquíolos até alcançar a faringe, onde são deglutidas para que ocorra a liberação nas fezes depois de decorridas de 6 a 8 semanas pós-infecção, variando de acordo com a linhagem do parasito.

No ambiente, as larvas L₁ podem ser ingeridas ou penetrarem ativamente no hospedeiro intermediário, onde passam por duas mudas (L₁ – L₂ – L₃) até atingir o estágio no qual as larvas se tornam infectantes ao hospedeiro definitivo.

O homem é um hospedeiro acidental se infectando ocasionalmente ao ingerir hospedeiros intermediários ou paratênicos crus ou mal cozidos que contenham as larvas infectantes (WANG et al., 2012).

Planárias, sapos, peixes, camarões, caranguejos e lagartos podem atuar como hospedeiros paratênicos de *A. cantonensis*. Nesses hospedeiros o parasito não se desenvolve, mas eles podem ser fontes de infecção (MORASSUTTI et al., 2014). Embora pouco conhecimento tenha sido gerado sobre a prevalência de *A. cantonensis* nos hospedeiros paratênicos, pequenas planárias podem representar uma forma importante e negligenciada de fonte de infecção para o homem através do consumo de vegetais crus ou mal cozidos que contenham planárias infectadas (WANG et al., 2008).

Na Nova Caledônia, 53% dos sapos (*Hyla aurea*) foram encontrados albergando larvas infectantes (ASH, 1968 *apud* WANG et al., 2008). Na Tailândia, em 95% dos lagartos analisados (n=22) foram observadas larvas de *A. cantonensis* e mais de 18 casos de angiostrongilíase neural na Tailândia, Sri Lanka e Índia foram associados ao consumo de lagartos (HIDELARATCHI et al., 2005 *apud* WANG et al., 2008).

A ecologia da angiostrongilíase está relacionada com o ambiente e fatores que favoreçam a sobrevivência da população de moluscos e roedores. A frequência da

parasitose em humanos depende da abundância desses hospedeiros, do grau em que eles estão infectados, do hábito alimentar (consumo de moluscos, crustáceos e peixes crus e verduras mal lavadas) e do contato direto com moluscos infectados ou com o muco liberado por eles (ACHA; SYFRES, 2003; WANG et al., 2008).

2.4.3 Angiostrongilíase neural

A angiostrongilíase neural é uma doença causada pela migração da larva de *A. cantonensis*, sendo caracterizada por um intenso infiltrado inflamatório na região cefálica. O processo patológico associado com a migração das larvas de *A. cantonensis* mostra-se bastante agressivo ao hospedeiro, resultando em reações que potencializam os sinais clínicos colocando em risco a sua vida (ALICATA, 1991).

Nomura e Lin descreveram a meningite eosinofílica causada por *A. cantonensis* em 1945, com base na observação do nematoide no fluido cerebrospinal de um paciente diagnosticado com meningite (PROCIV et al., 2000).

Angiostrongylus cantonensis ocorre com maior prevalência em países do sudeste Asiático e Ilhas do Pacífico. No entanto, este cenário começou a mudar após o primeiro relato de ocorrência no continente Americano, onde ratos e moluscos infectados foram encontrados em Cuba (AGUIAR et al., 1981). Posteriormente, *A. cantonensis* foi relatado nos Estados Unidos, Jamaica e Equador (KIM et al., 2002; SLOM et al., 2002; PINCAY et al., 2009) e mais recentemente no Brasil (CALDEIRA et al., 2007; LIMA et al., 2009; ESPÍRITO-SANTO et al., 2013).

Desde o primeiro caso de angiostrongilíase humana, mais de 2800 casos da doença foram registrados em aproximadamente 30 países até 2008 (WANG et al., 2008). Em 2012, outro levantamento foi realizado verificando que o número de casos de angiostrongilíase neural era 3161 em vários países do mundo (PUTHIYAKUNNON; CHEN, 2015).

No Brasil, foram relatados 84 casos suspeitos sendo confirmados 34 casos distribuídos nos estados do Espírito Santo, Recife, Pernambuco, Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná (MORASSUTI et al., 2014). Além dos nove casos diagnosticados anteriormente, dois no município de Cariacica, no estado de Espírito Santo, dois no estado de Pernambuco (municípios de Escada e Olinda) e cinco no estado de São Paulo foram também confirmados. Todos os casos foram causados pela ingestão de moluscos infectados por

larvas de terceiro estágio (L3) de *A. cantonensis* (CALDEIRA et al., 2007; THIENGO et al., 2010; LIMA et al. 2009).

Hospedeiros definitivos e intermediários foram encontrados naturalmente infectados em municípios brasileiros das regiões Norte, Nordeste, Sudeste e Sul. Larvas de *A. cantonensis* em moluscos ou adultos parasitando roedores foram encontrados no Amazonas, Bahia, Ceará, Espírito Santo, Pará, Paraná, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo (CALDEIRA et al., 2007; MALDONADO Jr et al., 2010; THIENGO et al., 2010; SIMÕES et al., 2011; CARVALHO et al., 2012; COGNATO et al., 2013; ESPÍRITO-SANTO et al., 2013; MOREIRA et al., 2013; MORASSUTTI et al., 2014) (Figura 5).



Figura 5: Mapa de distribuição de moluscos infectados por *Angiostrongylus cantonensis* e casos de angiostrongilíase neural no Brasil. Fonte: FIOCRUZ, 2014.

2.5 Importância do filo Mollusca no desenvolvimento de larvas de trematódeos e nematoides

Dentre as principais helmintoses de interesse médico e veterinário transmitidas por moluscos no Brasil a esquistosomose, a fasciolose e a angiostrongilíase assumem grande importância (MODENA et al., 1993; SERRA-FREIRE, 1995; THIENGO, 2007).

As angiostrongilíases são exemplos de doenças causadas por nematoides pertencentes ao gênero *Angiostrongylus*. Dentre as diversas espécies, duas assumem maior relevância *A. costaricensis*, agente etiológico da angiostrongilíase abdominal e *A. cantonensis* responsável pela angiostrongilíase neural, ambas apresentam potencial zoonótico (STEWART et al. 1985).

Em todos os casos citados, a participação do molusco é considerada vital ao desenvolvimento do parasito, possibilitando desenvolver estágios infectantes ao hospedeiro definitivo (PINHEIRO et al. 2009, TUNHOLI et al. 2011).

Atualmente, de acordo com Cribb et al. (2001), aproximadamente 40.000 espécies de trematódeos requerem moluscos para completar seu ciclo. Tais dados remetem claramente a importância de animais deste filo como hospedeiros intermediários de parasitos para animais silvestres e domésticos, assim como para o homem.

Registros sobre a fauna de helmintos associada aos gastrópodes límnicos foram realizados em 12 estados brasileiros. Neste, o gênero *Biomphalaria* tem sido associado a diferentes tipos de cercárias (BOAVENTURA et al., 2007). Além disso, trabalhos vêm demonstrando o envolvimento de um grande número de espécies de moluscos como hospedeiros potenciais no ciclo de alguns nematoides, confirmando a capacidade desses parasitos infectarem diferentes hospedeiros intermediários (BANEVICIUS et al., 2006; MORERA, 1988). Neste contexto, estudos têm comprovado a susceptibilidade de moluscos do gênero *Biomphalaria*, especialmente das espécies *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea* à infecções experimentais por *A. costaricensis* e *A. cantonensis* (TUNHOLI-ALVES et al., 2011; GRAEFF-TEIXEIRA et al., 1989, LIMA et al., 1992, YOUSIF; LAMMLER, 1977).

No Brasil, três espécies do gênero *Biomphalaria* têm sido reconhecidas como de maior importância epidemiológica: *B. glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila* fato este justificado pelo envolvimento direto de tais espécies na manutenção do ciclo biológico de

Schistosoma mansoni e a sua distribuição. Atualmente, a presença da *B. glabrata* foi registrada em 16 estados brasileiros, além do Distrito Federal ocupando toda a linha costeira (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008; CARVALHO et al., 2005). Este fato acrescido de sua importância epidemiológica faz da espécie *B. glabrata* uma das principais transmissoras de parasitos e, portanto de grande relevância tanto em medicina humana quanto em veterinária.

Embora a maioria dos estudos se concentre nas interações entre o hospedeiro e um parasito, evidências crescentes sugerem que as interações entre parasitos co-ocorrentes podem influenciar a patologia do hospedeiro, a transmissão do parasito e a evolução da virulência. A infecção concomitante ocorre principalmente por dois fatores: a ampla distribuição dos helmintos e natureza crônica da infecção (JOHNSON; BULLER, 2011).

A interação entre os parasitos dependem de variados fatores como a espécie, idade e isolado de hospedeiro utilizado; a espécie e isolado de parasito, a carga parasitária utilizada e o intervalo entre as infecções (JOHNSON; BULLER, 2011).

O sucesso da infecção depende de características comportamentais e fisiológicas mas também de adaptações bioquímicas do hospedeiro (TUNHOLI-ALVES et al., 2013).

2.5.1 Relação molusco x nematoide

Diferentes tipos de associações podem ser verificadas na relação entre moluscos e nematoides variando desde uma relação paratênica até uma condição de parasitismo. Mais de 108 espécies de nematoides tem confirmado algum grau de associação com moluscos, sugerindo um processo co-evolutivo estabelecido entre ambos os organismos (GREWAL et al., 2003).

Na relação paratênica, não são verificadas alterações significativas no estado metabólico do hospedeiro, uma vez que o hospedeiro paratênico é considerado como um organismo capaz de se infectar, mantendo viável a forma infectante para o hospedeiro definitivo, sem oferecer condições favoráveis ao processo evolutivo do parasito, funcionando como uma espécie de refúgio temporário até a infecção final podendo ser considerado como uma estratégia, que frequentemente aumenta as possibilidades de sobrevivência e de transmissão (ANDERSON, 2000).

A maioria dos strongylídeos utiliza moluscos como hospedeiros intermediários, possibilitando o desenvolvimento de larvas infectantes aos hospedeiros definitivos. Por outro lado, os Rhabditida acabam utilizando tais organismos como hospedeiros definitivos, permitindo o desenvolvimento completo do ciclo biológico dos nematoides.

Em associações em que nematoides utilizam moluscos como hospedeiro definitivo, três tipos de relação podem ser identificados. No primeiro tipo, os nematoides se desenvolvem na cavidade corporal de moluscos, porém as formas adultas são encontradas também no ambiente. No segundo tipo todo ciclo evolutivo do nematoide é realizado no hospedeiro, porém não são observadas alterações patológicas nos hospedeiros. O terceiro tipo de relação é aquela em que todo o ciclo biológico do nematoide ocorre no hospedeiro definitivo (molusco), porém diferentemente dos casos acima relacionados, a associação resulta em alterações patológicas e frequentemente levam a morte do animal.

2.5.2 Relação molusco x trematódeo

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

Moluscos apresentam um mecanismo específico de defesa. Dessa maneira, o sucesso do desenvolvimento de um trematódeo depende da estratégia que o helminto utiliza para escapar desse sistema e ao mesmo tempo, a capacidade para utilizar nutrientes do hospedeiro necessários para o seu metabolismo.

A sobrevivência do trematódeo no molusco está relacionada com a capacidade que o helminto tem de incorporar antígenos do hospedeiro e não ser reconhecido como um corpo estranho (BASCH, 1976) ou interferir no sistema de defesa do molusco (LIE, 1982). Em infecções onde moluscos são expostos a mais de uma espécie de trematódeo podem ocorrer interações antagônicas ou sinérgicas que irão depender do grau de dominância das espécies de trematódeos envolvidas.

Uma espécie de trematódeo exerce sua dominância (forte, moderada ou fraca) através de um antagonismo direto ou indireto. O antagonismo direto ocorre quando a rédia do trematódeo consome ativamente as larvas (esporocistos e rédias) de outras espécies,

excepcionalmente a rédia pode preda a cercária como descrito na interação do *E. malayanum* com *Schistosoma spindale* (Montgomery, 1906) em *Indoplanorbis exustus* (Deshayes, 1834) (HEYNEMAN; UMATHEV, 1968).

Considera-se que no antagonismo indireto a espécie dominante exerça sua ação através do efeito tóxico sobre a espécie subordinada ou aumentando a resposta imune do hospedeiro (LIM; HEYNEMAN, 1972).

2.6 Parâmetros fisiológicos

Nos últimos anos, aspectos bioquímicos envolvendo a interação entre parasito/hospedeiro têm recebido maiores atenções. Neste sentido, várias investigações têm sido realizadas utilizando metodologias voltadas na quantificação de diferentes substratos a fim de caracterizar o perfil metabólico e fisiológico do hospedeiro quando submetidos à infecção, pois se sabe que as infecções por trematódeos e nematoides resultam em alterações expressivas no estado metabólico e fisiológico de seus hospedeiros (BECKER, 1980).

2.6.1 Alterações reprodutivas em moluscos infectados

O parasitismo pode exercer influência sobre a atividade reprodutiva do molusco. De acordo com Baudoin (1975) pode ocorrer uma inibição total ou parcial da atividade reprodutiva do hospedeiro, sendo este fenômeno frequentemente observado na associação entre moluscos e trematódeos, sendo conhecida como castração parasitária. Tal fenômeno é resultado de ações físicas (CHENG; COOPERMAN, 1964) ou fisiológicas (PEARSON; CHENG, 1985) do parasito. Em ambos os casos, o parasito pode diretamente (PEARSON; CHENG, 1985) ou indiretamente (SCHALLIG et al., 1992) comprometer o desenvolvimento da gônada do hospedeiro.

Tunholi-Alves et al. (2011), verificaram uma redução contínua dos parâmetros reprodutivos de *B. glabrata* experimentalmente infectadas com *A. cantonensis* embora não tenha ocorrido a interrupção da atividade reprodutiva, o fenômeno foi caracterizado como castração parasitária parcial.

No entanto, também pode ser observado um aumento da atividade reprodutiva do hospedeiro como consequência da infecção. A este fenômeno, Minchella (1985),

denominou de compensação da fecundidade onde moluscos infectados aumentam seus esforços reprodutivos, minimizando perdas futuras que seriam ocasionadas por este estresse (TUNHOLI et al., 2011).

Frequentemente o parasitismo do molusco por larvas de trematódeos leva a uma diminuição ou supressão de sua capacidade reprodutiva (castração parasitária). Espécies de trematódeos que apresentam rédias durante seu desenvolvimento ontogenético geralmente são mais nocivas ao hospedeiro do que aquelas que só apresentam esporocistos (COMBES, 1982). Isso se deve ao microhabitat das rédias e ao fato destas possuírem abertura oral e faringe com uma musculatura bastante desenvolvida, conferindo-lhe a capacidade de ingerir tecidos do hospedeiro.

No entanto, Tunholi et al. (2011) observaram que a infecção experimental de *B. glabrata* com diferentes cargas parasitárias de *E. paraensei* (5 e 50 miracídios) provocou alterações significativas na atividade reprodutiva do hospedeiro, provavelmente como um mecanismo compensatório, aumentando o esforço reprodutivo dos moluscos infectados, embora não tenha sido observada alterações em função das cargas miracidiais utilizadas.

Assim, fica evidente a ausência de um padrão geral para todos os modelos de relação molusco/larva de trematódeo, sugerindo que as variações observadas nos aspectos reprodutivos de moluscos infectados são dependentes dos modelos utilizados e que, portanto, cada parasito é capaz de induzir alterações específicas em seus hospedeiros.

2.6.2 Alterações glicídicas em moluscos infectados

De acordo com Becker (1980), ao invadir o hospedeiro intermediário, as larvas de trematódeos induzem mudanças significativas no padrão metabólico do molusco hospedeiro, induzindo-o frequentemente a um estado de balanço energético negativo, pois passam a competir diretamente por nutrientes e utilizá-los em benefício próprio, causando no hospedeiro um estado nutricional semelhante ao observado durante períodos de jejum severo. Além disso, os parasitos liberam seus produtos de excreção/secreção no organismo hospedeiro, causando severas alterações.

Essas alterações são frequentemente observadas em moluscos infectados, principalmente nos gastrópodes pulmonados onde o metabolismo energético é mantido principalmente mediante o consumo de glicose (JOOSSE, 1988). Thompson e Lee (1986)

afirmaram que os conteúdos de glicose na hemolinfa de moluscos são precisamente regulados a partir de mecanismos fisiológicos integrados, garantindo dessa forma variações compatíveis a sua sobrevivência mesmo em situações adversas, como na infecção.

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

Para manter a normoglicemia da hemolinfa, os moluscos utilizam suas reservas de glicogênio localizadas principalmente na glândula digestiva e no tecido muscular (PINHEIRO et al., 2009; PINHEIRO; AMATO, 1994).

O glicogênio assume grande importância na manutenção do estado energético uma vez que a partir da sua degradação ocorre a liberação de metabólitos que rapidamente podem ser convertidos em glicose livre.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Os objetivos dessa dissertação foram investigar as alterações na biologia reprodutiva e no metabolismo glicídico de *B. glabrata* experimentalmente co-infectada com o nematoide *A. cantonensis* e o trematódeo *E. paraensei*.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar o perfil reprodutivo de *B. glabrata* experimentalmente co-infectada por *A. cantonensis* e *E. paraensei*, utilizando como parâmetros o número de massas ovíferas/molusco, número de ovos/massa ovíferas, número de ovos/molusco, assim como a viabilidade desses ovos.
- Investigar alterações bioquímicas de *B. glabrata* experimentalmente co-infectada por *A. cantonensis* e *E. paraensei*, verificando os conteúdos hemolinfáticos de glicose e de glicogênio estocado na glândula digestiva e na massa cefalopediosa, assim como a atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH).
- Verificar alterações histológicas e histoquímicas causadas pela presença de *A. cantonensis* e *E. paraensei* em *B. glabrata* utilizando hematoxilina-eosina (HE) e PAS para evidenciação de glicogênio.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção das formas infectantes

O isolado de *E. paraensei* utilizado foi obtido a partir da coleta de amostras de roedores silvestre *N. squamipes* naturalmente infectados, capturados em Sumidouro, RJ, Brasil em 2001 (22°02'46 "S, 42°41'21" W). O ciclo de vida vem sendo mantido no Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios - LABPMR (IOC), Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Rio de Janeiro, utilizando hamsters (*Mesocricetus auratus*) como o hospedeiro definitivo e *B. glabrata* como primeiro e segundo hospedeiros intermediários.

Hamsters adultos infectados com *E. paraensei* foram sacrificados em câmara de CO₂ (com aprovação do Comitê de Ética Sobre o Uso de Animais da FIOCRUZ - LW-51/14). Os vermes adultos foram coletados no intestino delgado e transferidos para placas de Petri contendo solução de NaCl a 0,9%. Os úteros dos helmintos foram dissecados para libertação dos ovos, os quais foram lavados e incubados em água desclorada a 26°C durante 14 dias. Após este período, os ovos foram expostos à lâmpada incandescente (100W, 127V) para estimular a eclosão de miracídios (PINHEIRO et al, 2004; MALDONADO et al, 2001b).

Os espécimes de *A. cantonensis* utilizados neste estudo foram obtidos a partir de exemplares de *A. fulica* naturalmente infectados capturados em São Gonçalo, RJ, Brasil em 2011 (22°48'26.7 "S, 43°00'49.1"W). O ciclo biológico deste parasito vem sendo mantido no LABPMR usando *R. norvegicus* como hospedeiro definitivo e *B. glabrata* como hospedeiro intermediário. Esta etapa do experimento foi aprovada pelo Comitê de Ética Sobre o Uso de Animais da FIOCRUZ (LW 47/14). As larvas de primeiro estágio (L₁) foram obtidas após a coleta e processamento das fezes dos roedores experimentalmente infectados (WILLCOX; COURA, 1989).

4.2 Infecção experimental e formação de grupos

Biomphalaria glabrata (8-10 mm de diâmetro de concha), criados em laboratório a partir de exemplares coletados em Sumidouro, RJ, Brasil, foram divididos em cinco grupos, cada uma contendo 20 moluscos. Um grupo controle foi estabelecido com moluscos não

infectados. O grupo A foi formado por moluscos infectados individualmente por exposição a 1200 L1 de *A. cantonensis* durante 48 h, o grupo E foi exposto individualmente a 20 miracídios de *E. paraensei* durante 24h. No grupo A + E, a infecção inicial foi por *A. cantonensis* e uma semana mais tarde o grupo foi exposto individualmente a miracidios de *E. paraensei* como descrito acima. O Grupo E + A foi infectado individualmente com *E. paraensei* e uma semana mais tarde foi exposto ao *A. cantonensis*. Este procedimento foi realizado em duplicata (n=200).

Após a infecção experimental, os moluscos foram mantidos em tanques de plástico (22cm de comprimento por 14,5cm de largura e 12,5cm de altura) contendo 3L de água desclorada (trocada a cada 2 semanas) com temperatura entre $28\pm 1^{\circ}\text{C}$, condições de luminosidade ambiente, alimentados com folhas de alface fresca (*Lactuca sativa*) e com duas placas de isopor (4 cm x 4 cm), as quais serviram de substrato para a oviposição, até ao final do experimento. Os moluscos mortos foram removidos e substituídos por espécimes submetidos às mesmas condições experimentais, sendo mantida a densidade populacional de 20 moluscos em cada aquário durante todo o período analisado.

A infecção dos moluscos utilizados neste estudo foi confirmada como descrito por Bonfim et al. (2014) que mostra uma taxa de infectividade acima de 95% para *A. cantonensis* e, após o período de exposição, não foram detectados miracídios de *E. paraensei* nas placas de infecção.

4.3 Análises de biologia reprodutiva

Três vezes por semana durante quatro semanas após a exposição, as placas de isopor foram removidas dos aquários, e novas placas foram adicionadas, e o número de posturas e de ovos foram contados, sob um microscópio estereoscópico. Posteriormente, as placas foram identificadas e colocadas em novos aquários livres de moluscos. As posturas foram observadas semanalmente para contar o número de moluscos eclodidos. O número de moluscos mortos foi contado três vezes por semana, e a mortalidade foi expressa em porcentagem (%). A viabilidade, expressa em porcentagem (%), corresponde ao número de moluscos eclodidos dividido pelo número de ovos, multiplicado por 100.

4.4 Análises bioquímicas

Decorridas as 4 semanas de infecção, 10 moluscos de cada aquário foram escolhidos aleatoriamente para dissecação e punção da cavidade pericárdica. Amostras de hemolinfa, glândula digestiva e massa cefalopediosa foram coletadas em banho de gelo e armazenadas a -10°C até a realização das análises.

4.4.1 Análise da concentração de glicose

A determinação bioquímica da concentração de glicose na hemolinfa dos moluscos foi feita através da utilização de kits de diagnóstico laboratorial da marca Doles®.

Resumidamente, 10µl de amostra foram adicionados a 1ml do reagente colorimétrico, esse procedimento é realizado em triplicata. O produto formado é de coloração avermelhada e a intensidade da cor obtida é diretamente proporcional à concentração de glicose na solução. Em seguida, a intensidade da cor é mensurada em um espectrofotômetro, com absorção máxima regulada em 510nm.

4.4.2 Análise da atividade da lactato desidrogenase

A atividade da enzima lactato desidrogenase (L- desidrogenase láctica) (EC 1.1.1.27) (LDH) foi determinada através de kits de diagnóstico laboratorial (Doles®).

Foram misturados 1ml da solução de substrato, uma gota de solução de 0,012M de sulfato de ferro amoniacal e 25µl de amostra, esta mistura foi incubada a 37°C por 2 minutos. Posteriormente, foi adicionada uma gota da solução contendo 15,82mmolar de nicotidamida adenina dinucleotídeo (NAD) e 3,73mmolar de fenazina metassulfato (FMS), sendo a mistura incubada a 37°C durante 5 minutos. A reação foi estabilizada com a adição de 1ml de solução de ácido clorídrico 0,5M.

Após a homogeneização, a absorbância foi mensurada em um espectrofotômetro em 510nm.

4.4.3 Análise da concentração de glicogênio

Os conteúdos de glicogênio da glândula digestiva e da massa cefalopediosa foram extraídos segundo Pinheiro e Gomes (1994) e determinados de acordo com o método 3,5 dinitro salicilato (DNS) (SUMNER, 1924).

4.5 Análise histológica e histoquímica

Seis moluscos de cada grupo foram dissecados após quatro semanas, para remoção das partes moles, estas foram colocados no fixador formalina Millonig de Carson durante 24h. Em seguida, o material foi desidratado com o aumento da concentração de etanol, clarificadas com xilol e embebidas em parafina líquida a 60°C (TOLOSA et al., 2003). A inclusão foi realizada para permitir a observação de secções longitudinais da estrutura do corpo do molusco nas lâminas histológicas. Cortes seriados com 5 µm de espessura foram obtidos utilizando um micrótomo Leica RM2125. O material foi de corado com hematoxilina-eosina (HE) e ácido periódico-Schiff (PAS) para detecção de glicogênio. As lâminas foram observadas sob um microscópio de luz Axiosplan Zeiss, as imagens foram obtidas utilizando uma câmara Zeiss Axio Cam HRc e processadas pelo Axio Vision Rel. Software 4.8.

4.6 Análises estatísticas

Os dados reprodutivos foram expressos como média±erro padrão e o grupo controle foi comparado com os grupos infectados através do teste de Dunnett ($\alpha = 5\%$). (InStat, GraphPad, V.4.00, Prisma, GraphPad, v.3.02, Prisma Inc.).

Os resultados numéricos obtidos a partir das análises bioquímicas foram expressos como média±desvio padrão e submetidos ANOVA e ao teste de Tukey-Kramer ($\alpha = 5\%$). (InStat, GraphPad, v.4.00, Prism, GraphPad, v.3.02, Prism Inc.).

5. RESULTADOS

Uma redução significativa foi observada no número de posturas/molusco nos grupos infectados quando comparado com o controle (Tabela 1). Porém, a maior alteração observada foi uma redução de 54,73% no número de posturas/molusco no grupo E + A em comparação com o grupo controle.

O número de ovos/posturas nos grupos infectados não variou significativamente em relação ao grupo controle (Tabela 1).

Uma diminuição significativa foi observada no número de ovos/molusco nos grupos infectados em comparação com o controle (Tabela 1), sendo o maior percentual de redução de 61,14% no número de ovos/molusco no grupo E + A, em comparação com o grupo controle.

Houve também um decréscimo significativo no número de moluscos eclodidos em todos os grupos infectados em comparação com o controle (Tabela 1). A maior redução foi de cerca de 72,97% no grupo E + A em comparação com o controle negativo.

A mortalidade foi maior entre os grupos infectados com *A. cantonensis* em comparação com o grupo controle, sendo maior no grupo E + A (Tabela 1).

Tabela 2: Efeitos da reprodução e mortalidade de *Biomphalaria glabrata* co-infectada com *Angiostrongylus cantonensis* e *Echinostoma paraensei*. Dados expressos em média \pm erro padrão.

Grupo	Posturas/molusco	Ovos/posturas	Ovos/molusco	Moluscos eclodidos	Mortalidade (%)
Controle	0.67 \pm 0.11 ^a	11.29 \pm 0.53 ^a	7.54 \pm 1.36 ^a	249.54 \pm 49.70 ^a	25
A	0.33 \pm 0.06 ^b	10.62 \pm 1.36 ^a	3.72 \pm 0.80 ^b	99.69 \pm 24.09 ^b	27,5
E	0.36 \pm 0.08 ^b	9.20 \pm 0.69 ^a	3.53 \pm 0.74 ^b	94.85 \pm 23.74 ^b	20
A+E	0.38 \pm 0.07 ^b	8.48 \pm 0.69 ^a	3.66 \pm 0.89 ^b	103.54 \pm 30.76 ^b	30
E+A	0.32 \pm 0.07 ^b	9.54 \pm 0.62 ^a	2.93 \pm 0.62 ^b	67.46 \pm 15.44 ^b	32.5

^{a, b, c} Grupos com diferentes letras apresentam diferenças significativas ($\alpha = 5\%$)

A concentração de glicose hemolinfática foi significativamente reduzida nos moluscos infectados em comparação com o grupo controle. O grupo E+A apresentou o maior decréscimo, com o valor encontrado equivalente a 77,29% do valor observado no controle (Tabela 2).

No entanto, em todos os grupos formados por moluscos infectados foi observado um aumento significativo da atividade da LDH. O grupo E + A apresentou a maior atividade enzimática, com o valor encontrado equivalente a 579,27% do valor registrado no grupo controle (Tabela 2).

Foi verificada uma redução significativa no conteúdo de glicogênio quantificado a partir da massa cefalopédica dos moluscos infectados em relação ao grupo controle negativo. Adicionalmente, os grupos experimentalmente infectados com *A. cantonensis* mostraram diferenças significativas quando comparados com o grupo E (Tabela 2).

A concentração de glicogênio avaliada a partir do complexo glândula digestiva-gônada também reduziu nos moluscos infectados quando comparados com os moluscos controle. Apesar da diminuição dos valores encontrados nos grupos onde a infecção com *A. cantonensis* ocorreu, eles não apresentaram diferença significativa quando comparados ao grupo E (Tabela 2).

Tabela 3: Influência da co-infecção com *Angiostrongylus cantonensis* e *Echinostoma paraensei* sobre o metabolismo de carboidratos de *Biomphalaria glabrata*. Dados expressos em média \pm desvio padrão.

Grupo	Concentração de glicose (mg/dl)	Concentração de glicogênio (mg de glucose/g de tecido, peso fresco)		Atividade de LDH (UI)
		Massa cefalopédica	Complexo glândula digestiva-gônada	
Controle	103.16 \pm 2.41 ^a	9.02 \pm 0.25 ^a	11.34 \pm 0.52 ^a	1.64 \pm 0.07 ^a
E	42.52 \pm 2.33 ^b	6.41 \pm 0.35 ^b	5.26 \pm 0.01 ^b	9.42 \pm 0.08 ^b
A	71.07 \pm 1.67 ^c	4.51 \pm 0.14 ^c	4.99 \pm 0.30 ^b	8.35 \pm 0.70 ^b
A+E	35.71 \pm 1.17 ^d	4.16 \pm 0.28 ^c	4.64 \pm 0.11 ^b	9.25 \pm 0.18 ^b
E+A	23.43 \pm 1.35 ^e	4.02 \pm 0.22 ^c	4.19 \pm 0.13 ^b	11.14 \pm 0.31 ^c

^{a, b, c} Grupos com diferentes letras apresentam diferenças significativas ($\alpha = 0,1\%$).

Larvas de *A. cantonensis* foram observadas principalmente na massa cefalopédica, tentáculos e parede intestinal, mas também foram encontrados no coração, rim, ovoteste, glândula digestiva e ao redor das glândulas prostática, nidamental e de albúmen. A presença de *E. paraensei* foi observada mais frequentemente na glândula digestiva e ovoteste e mais raramente na parede intestinal, tentáculos, rim e próximo ao coração (Figura 6).

Dessa forma, verificou-se a presença de ambos os estágios de desenvolvimento dos parasitos no ovoteste (Figura 7) e na glândula de albúmen (Figura 8), órgãos associados com a atividade reprodutiva.

Na figura 7A, podemos observar que mesmo com a presença do nematoide a estrutura tecidual está preservada, o que não ocorre na presença de *E. paraensei* (Figura 7B e 7C), onde se verifica uma intensa multiplicação assexuada associada à danos teciduais acentuados quando comparados com o controle negativo (Figura 7D). A estrutura acinar da glândula de albúmen dos moluscos infectados sofreram alterações expressivas na presença dos parasitos, de forma que os maiores danos foram observados nos grupos infectados com *E. paraensei* (Figura 8). Alterações similares podem ser observadas na glândula digestiva (Figura 9).

Apesar de ter como localização preferencial a glândula digestiva, *E. paraensei* também foi observado na massa cefalopédica juntamente com intensas e numerosas reações granulomatosas que encapsularam as larvas de *A. cantonensis* (Figura 10).

Foi verificada uma intensa desorganização tecidual nos moluscos infectados, embora a presença do trematódeo tenha se mostrado mais prejudicial. No entanto, a presença das larvas de *A. cantonensis* foi associada com numerosas reações granulomatosas com intenso infiltrado inflamatório.

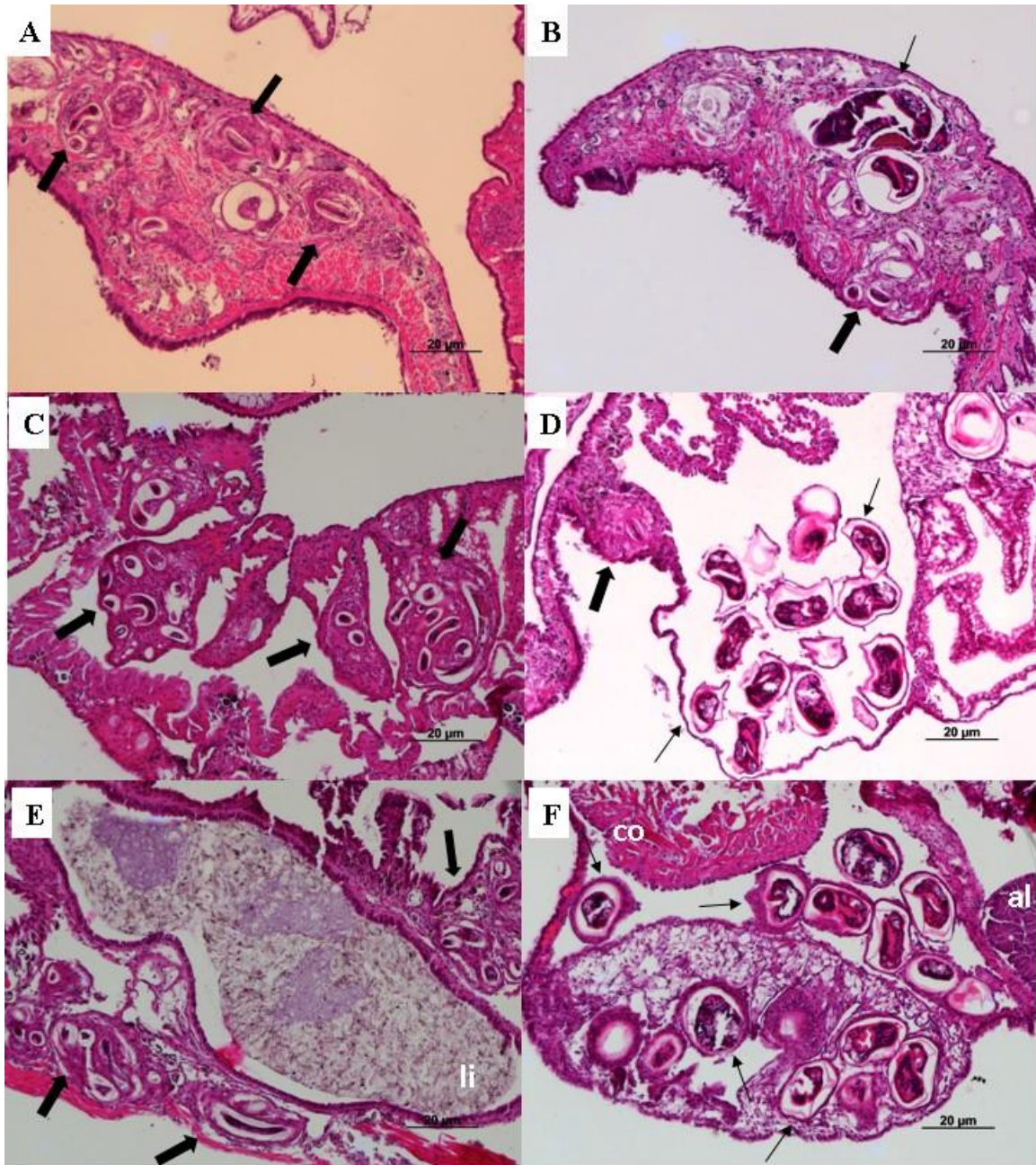


Figura 6: Cortes histológicos de diferentes órgãos de *Biomphalaria glabrata* experimentalmente co-infectada por *Echinostoma paraensei* e *Angiostrongylus cantonensis* corados com HE. A) Secção do tentáculo de um molusco infectado com *A. cantonensis*. Escala = 20 µm B) Presença de larvas de *A. cantonensis* e *E. paraensei* no tentáculo de *B. glabrata* co-infectada. Escala = 20 µm C) Numerosas larvas no rim de *B. glabrata* infectada por *A. cantonensis*. Escala = 20 µm. D) Presença de rídias e granuloma no rim de *B. glabrata* co-infectada. Escala = 20 µm. E) Larvas de *A. cantonensis* encapsuladas ao redor da luz intestinal. Escala = 20 µm (li); F) Rídias de *E. paraensei* próximas ao coração (co) e glândula de albúmen (al). Escala = 20 µm.

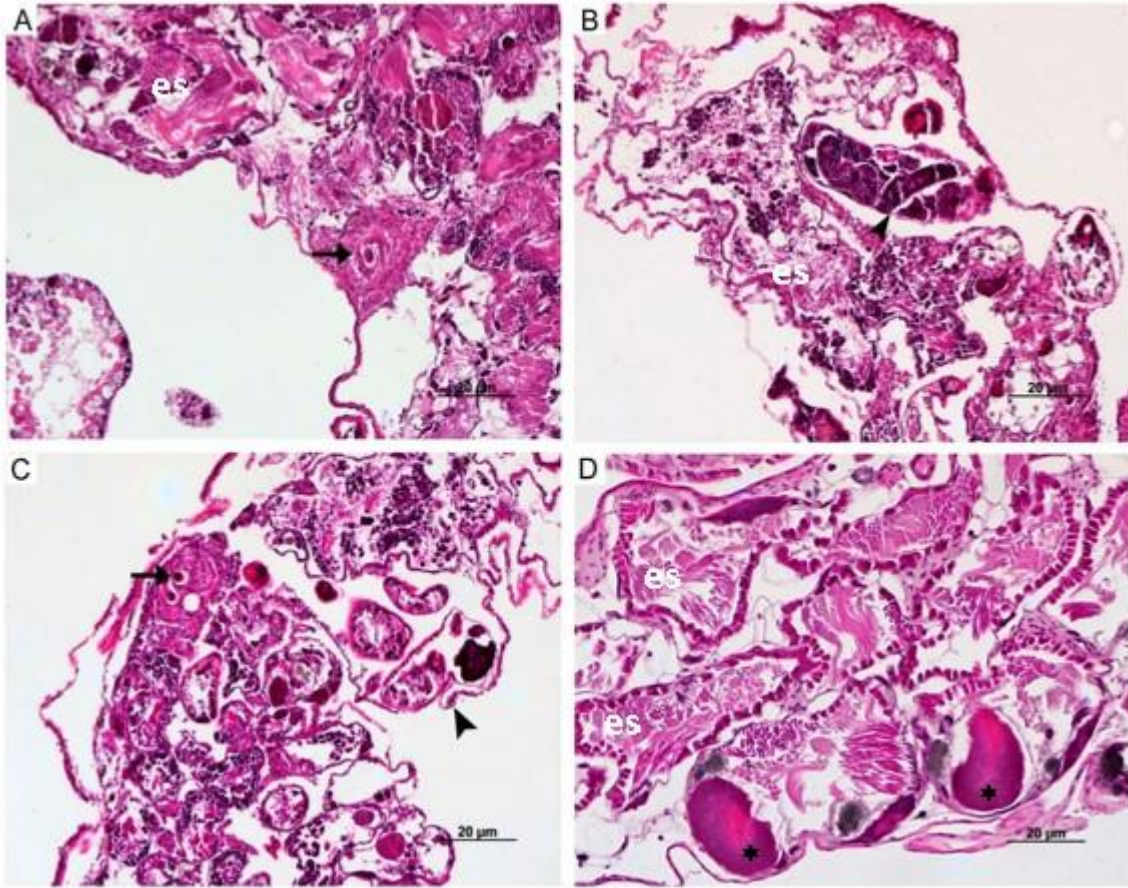


Figura 7: Corte histológico do ovoteste de *Biomphalaria glabrata* experimentalmente co-infectada por *Echinostoma paraensei* (▶) e *Angiostrongylus cantonensis* (➡) corado com hematoxilina-eosina. (A) Secção do molusco infectado com *A. cantonensis* mostrando um granuloma perilarvar e a região do ovoteste funcionalmente ativa, com a estrutura dos ácinos contendo espermatozoides (es) agrupados. Escala = 20 µm. (B) Secção de molusco infectado por *E. paraensei* mostrando a presença de rédias no ovoteste e um grupo de espermatozoides. Escala = 20 µm. (C) Secção de um molusco co-infectado mostrando estágios de desenvolvimento de ambos parasitos, com intensa desorganização tecidual. Escala =20 µm. (D) Secção de um molusco controle mostrando a região do ovoteste contendo ácinos com oócitos (*), espermatozoides e maior preservação tecidual. Escala =20 µm.

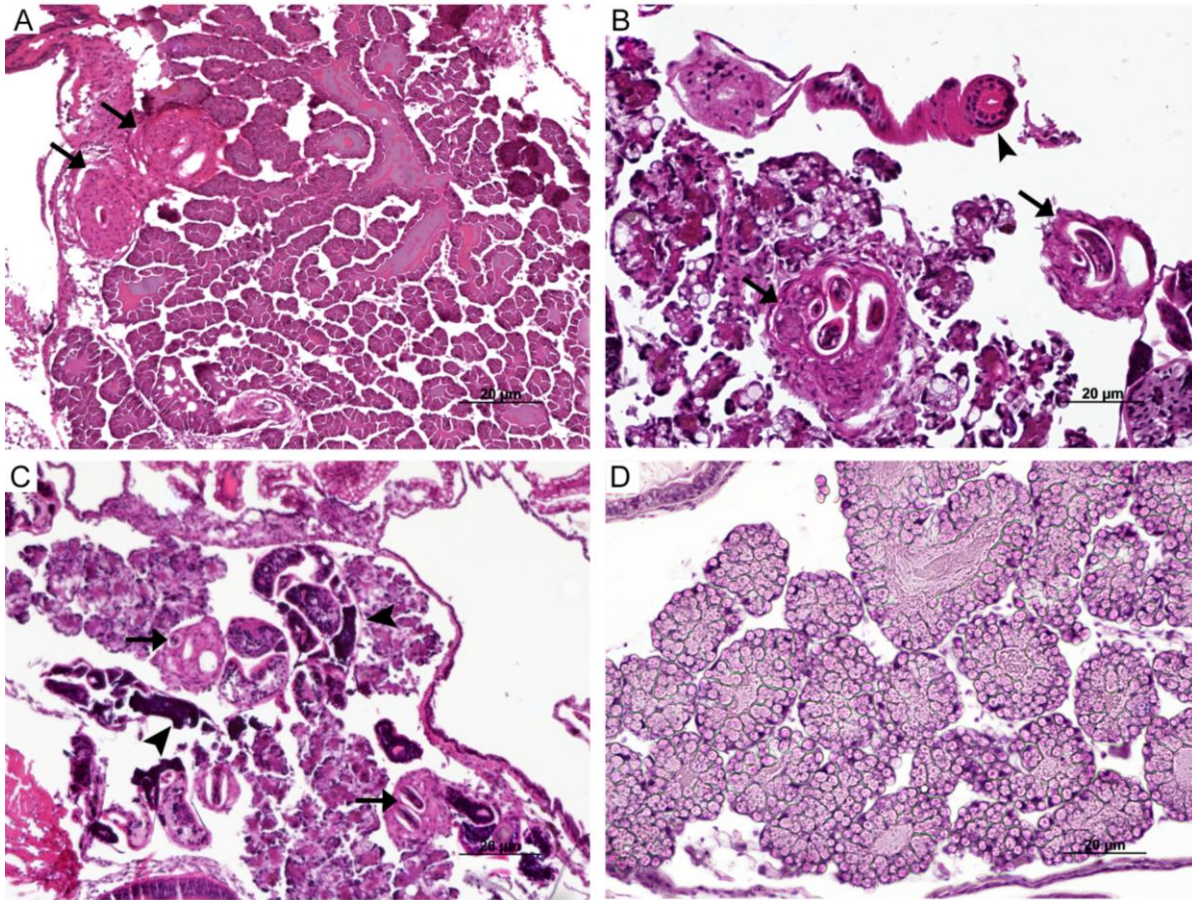


Figura 8: Corte histológico da glândula de albumem de *Biomphalaria glabrata* experimentalmente co-infectada por *Echinostoma paraensei* (▶) e *Angiostrongylus cantonensis* (➡) corado com hematoxilina-eosina. (A) Secção de molusco infectado por *A. cantonensis* mostrando a presença de granulomas perilarvais e a preservação estrutural dos ácinos. Escala 20µm; (B) Secção de molusco co-infectado com indicação da presença de rédias e larvas na glândula de albumem associados à intensa desorganização estrutural. Escala 20µm; (C) Secção de molusco co-infectado com intensa desorganização tecidual e estágios de desenvolvimento de ambos os parasitos. Escala 20µm; (D) Secção de um molusco controle negativo mostrando um tecido íntegro. Escala =20 µm.

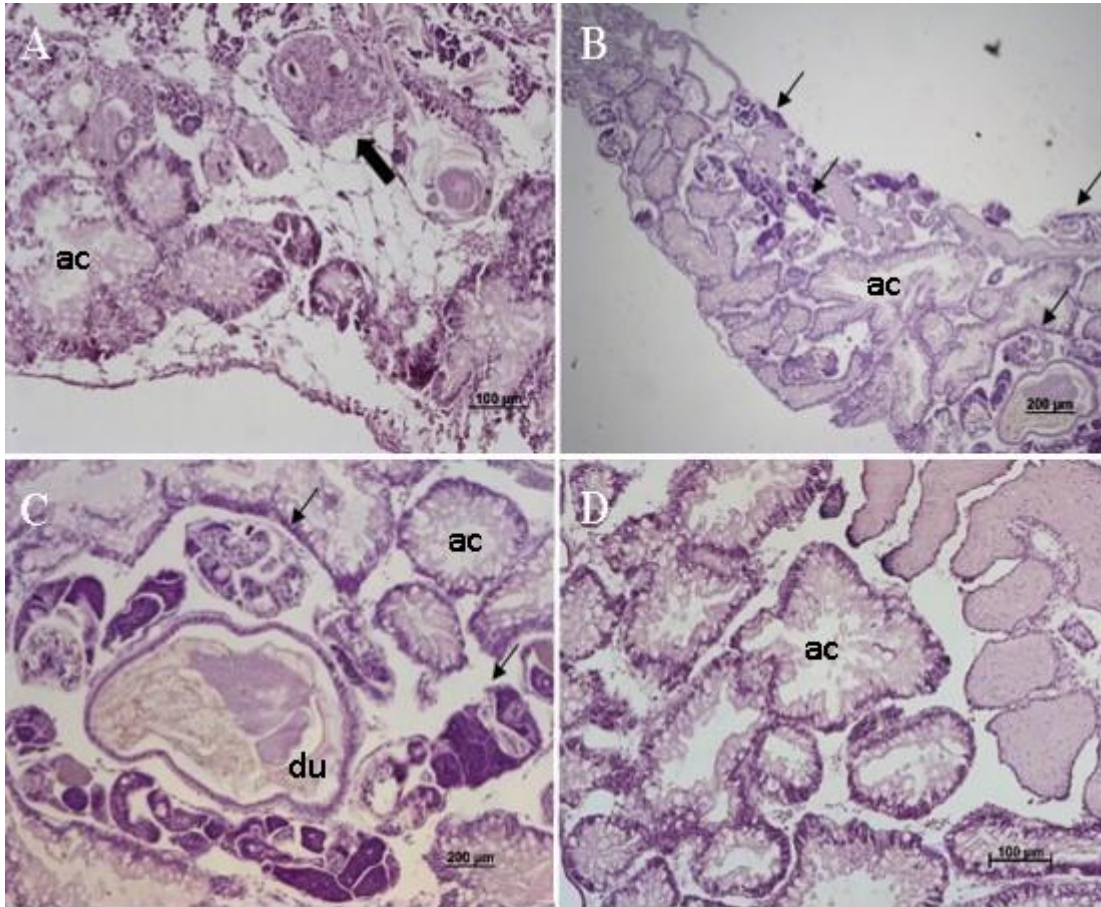


Figura 9: Corte histológico da glândula de digestiva de *Biomphalaria glabrata* experimentalmente co-infectada por *Echinostoma paraensei* (→) e *Angiostrongylus cantonensis* (➔) corado com PAS. (A) Secção de molusco infectado com *A. cantonensis* indicando a presença de reações granulomatosas com degradação dos ácinos (ac). Escala: 100µm; (B) Secção de molusco infectado com *E. paraensei* apresentando numerosas rídias. Escala: 200µm; (C) Secção de molusco infectado com *E. paraensei* com rídias ao redor de um ducto (du). Escala: 200µm; (D) Secção de molusco controle negativo mostrando a integridade do tecido. Escala: 100µm.

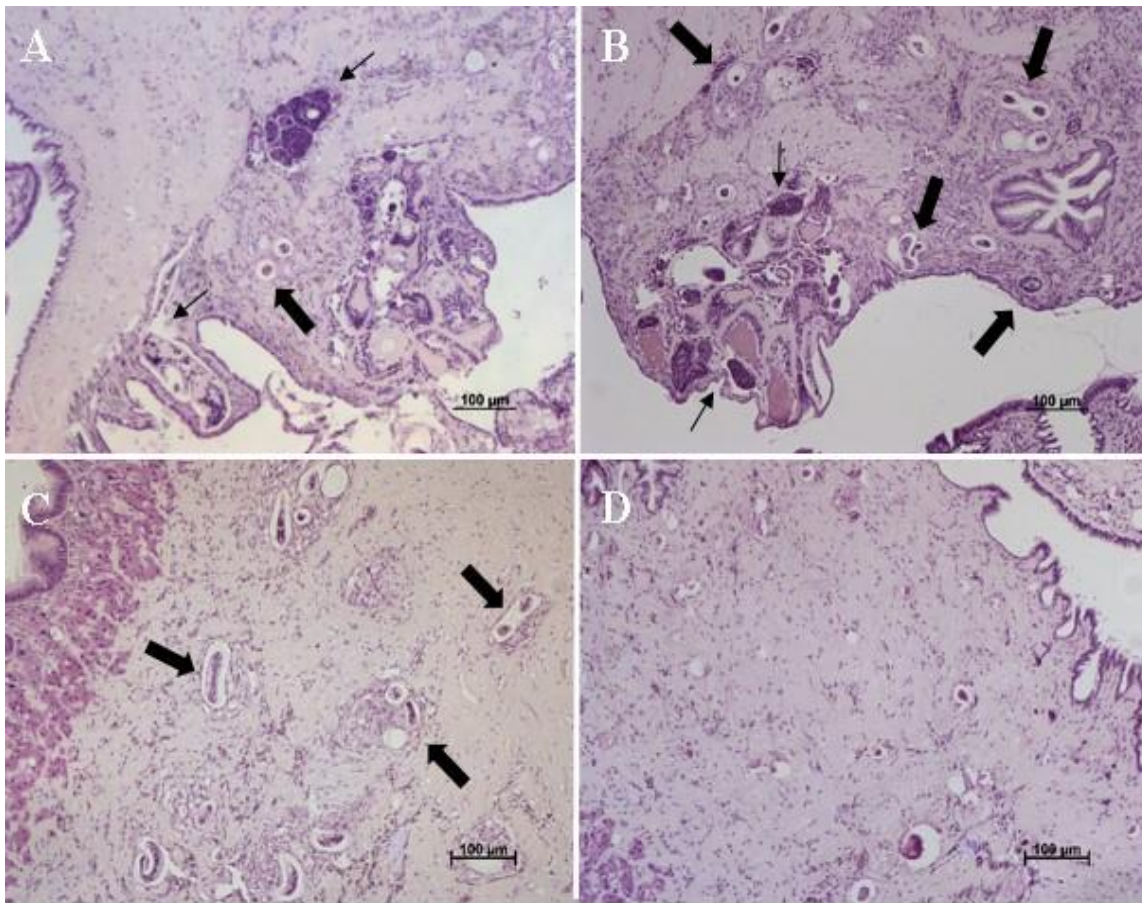


Figura 10: Corte histológico da massa cefalopédica de *Biomphalaria glabrata* experimentalmente co-infectada por *Echinostoma paraensei* (→) e *Angiostrongylus cantonensis* (➤) corado com PAS. (A) Secção de molusco co-infectado indicando a presença de reações granulomatosas e de estágios evolutivos de *E. paraensei*. Escala: 100µm; (B) Secção de molusco co-infectado apresentando numerosas rédias e reações granulomatosas. Escala: 100µm; (C) Secção de molusco infectado com *A. cantonensis* mostrando numerosas reações granulomatosas ao redor das larvas. Escala: 100µm; (D) Secção de molusco controle negativo mostrando a integridade do tecido. Escala: 100µm.

6. DISCUSSÃO

Tunholi-Alves et al. (2011), ao estudar a relação *B. glabrata*-*A.cantonensis*, observaram uma redução contínua nos parâmetros reprodutivos, sem que ocorresse a interrupção da atividade reprodutiva. No entanto, Tunholi et al. (2011), observaram uma compensação da atividade reprodutiva em *B. glabrata* infectada com miracídeos de *E. paraensei*. Bonfim et al. (2014) mostraram que a co-infecção de *B. glabrata* por *A. cantonensis* e *E. paraensei* leva a competição entre os parasitos e o hospedeiro por nutrientes. Consequentemente, o hospedeiro não consegue armazenar galactogênio, um importante componente do fluido perivitelínico.

No presente estudo, a co-infecção com *E. paraensei* e *A. cantonensis* causou alterações no desempenho reprodutivo e na organização tecidual dos moluscos. Observou-se uma acentuada redução na proporção de posturas por molusco e ovos por molusco bem como no número de moluscos eclodidos em todos os grupos infectados, principalmente no grupo exposto inicialmente a *E. paraensei* e depois a *A. cantonensis*, resultado este que se assemelhou àqueles obtidos por Tunholi-Alves et al. (2011) no estudo da relação *B. glabrata*-*A.cantonensis*.

No grupo E+A, as exposições aos parasitos ocorrem com uma semana de intervalo, de modo que a formação das rédias de *E. paraensei* coincide com a penetração e de migração das larvas de *A. cantonensis* nos moluscos, possivelmente explicando o maior comprometimento da reprodução no grupo co-infectado E + A, uma vez que as rédias possuem abertura oral e faringe com musculatura bastante desenvolvida, o que permite que haja um maior dano físico aos tecidos, pois além da pressão mecânica em decorrência da rápida e extensa multiplicação assexuada das larvas de trematódeos, há ainda a retirada de partes do tecido do hospedeiro pela ação mecânica direta das rédias destes parasitos.

Os resultados obtidos nesse estudo nos permite sugerir que a biologia reprodutiva do molusco *B. glabrata* está intimamente relacionado com a competição surgida em decorrência do desenvolvimento intramolusco de ambos parasitos. Assim, ainda como parte do presente estudo, demos início a investigação das possíveis alterações fisiológicas surgidas em *B. glabrata* em resposta à co-infecção com *A. cantonensis* e *E. paraensei* nos diferentes protocolos aqui estabelecidos.

A redução da atividade reprodutiva pode ter sido desencadeada pela tentativa do hospedeiro de manter a homeostase para preservar as funções fisiológicas basais. Uma vez que, muitos estudos têm demonstrado alterações no metabolismo de moluscos infectados por larvas de trematódeos, que além de retirar da hemolinfa os nutrientes necessários para o seu desenvolvimento, libera seus produtos de excreção/secreção, culminando na alteração da composição da hemolinfa (de SOUZA et al., 2000).

Nossas análises mostram uma redução acentuada nos conteúdos de glicose e glicogênio estocado tanto na massa cefalopediosa quanto no complexo glândula digestiva – gônada, em contrapartida, observamos um aumento da atividade de LDH. Pinheiro e Amato (1994) verificaram que a presença de esporocistos de *Eurytrema coelomaticum* (Giard et Billet, 1892) Looss, 1907 na superfície externa da glândula digestiva de *Bradybaena similis* (Fèrussac, 1821) apresentariam a habilidade de remover monômeros de glicose necessários para a realização de processos metabólicos observados durante o desenvolvimento intramolusco desse parasito, resultando em reduções que ultrapassaram a 90% no conteúdo de glicogênio na glândula digestiva e massa cefalopediosa do molusco ao final do período pré-patente. Dessa forma, foi observada a capacidade de incorporar monômeros de glicose a partir da hemolinfa do hospedeiro pelas larvas de trematódeos.

Em resposta ao parasitismo, em *L. columella* infectada com *E. paraensei*, o molusco entra em um estado de balanço energético negativo e mobiliza as suas reservas glicídicas, como o glicogênio estocado principalmente na glândula digestiva e em segundo plano na massa cefalopediosa, como uma alternativa metabólica para assegurar a sua sobrevivência (PINHEIRO et al., 2009).

Mas foram Tunholi et al. (2013) e Tunholi-Alves et al. (2013) que estudando os modelos *B. glabrata/E. paraensei* e *B. glabrata/A.cantonensis*, respectivamente, que primeiro observam as alterações nos conteúdos de carboidratos do molusco hospedeiro parasitado pelas larvas destes helmintos, relacionando tais reduções com a atividade da LDH.

Esses resultados indicam que os moluscos estão lançando mão da degradação do glicogênio para manutenção da homeostase glicêmica. Tal ideia é reforçada por Thompson e Lee (1986) ao verificarem que *B. glabrata* submetidas a períodos de jejum, bem como infectadas por *S. mansoni* mantiveram os níveis de glicose constantes na hemolinfa,

levando estes autores a postularem a existência de um ou mais mecanismos homeostáticos que atuam de forma muito precisa para manter(em) a normoglicemia, seja a partir da mobilização de reservas, utilização de substratos alternativos ou da modulação de vias bioquímicas (BECKER, 1980; CREWS; YOSHINO, 1990).

No entanto, no presente estudo, quando observamos a co-infecção, mesmo com a mobilização dessas reservas de glicogênio, os níveis de glicose não se aproximam da normalidade, sendo necessária a utilização de outro mecanismo que permite ao molusco atingir a normoglicemia. Sendo assim, ocorre a aceleração do metabolismo anaeróbio, através da fermentação láctica, atuando como uma via alternativa de manutenção energética do hospedeiro e dos estágios de desenvolvimento do trematódeo.

Stewart e colaboradores (1985) ao verificarem as alterações patofisiológicas em *B. glabrata* infectadas por *A. costaricensis*, observaram o aumento nos níveis hemolinfáticos de glicose a partir do 12º dia pós infecção, alcançando valores significativamente maiores no 27º dia de infecção em comparação com o grupo não infectado. O aumento do conteúdo de glicose ocorreu simultaneamente à diminuição dos conteúdos de glicogênio da massa cefalopodia e do aumento do conteúdo desse polissacarídeo na glândula digestiva dos animais infectados.

Brockelman e Sithitarvorn (1980), verificaram que a infecção por *A. cantonensis* em *A. fulica* ocasionou uma diminuição nos conteúdos de glicose na primeira semana de infecção, de forma que o molusco hospedeiro se mostrou capaz de reestabelecer seu nível glicêmico logo em seguida. Além disso, os resultados mostraram que a infecção não afetou as reservas de carboidratos na glândula digestiva do molusco.

Os estudos citados acima nos auxiliam no entendimento de que o gasto energético imposto a organismos submetidos às situações de estresse fisiológico, como o parasitismo por larvas de helmintos, leva o hospedeiro a um maior consumo energético, aceleração da glicólise assim como a modulação da atividade do sistema endócrino (de JONG-BRINK et al., 1988).

Apesar dos resultados obtidos no presente estudo indicarem que o molusco lança mão dos carboidratos de reserva para a manutenção da concentração de glicose na hemolinfa, observamos que, mesmo com a mobilização dessa reserva, os níveis de glicose não se aproximam da normalidade, sendo necessária a utilização de outro mecanismo que

favoreça o molusco a atingir a normoglicemia. Sendo assim, ocorre a aceleração do metabolismo anaeróbio, atuando como uma via alternativa de manutenção energética do hospedeiro e dos estágios de desenvolvimento dos helmintos, permitindo ainda a reoxidação do NADH.H⁺ citossólico, o que é desejável para que a via glicolítica possa continuar funcionando sem redução da sua atividade.

As respostas fisiológicas do hospedeiro estão associadas à adequação evolutiva entre o parasito e o hospedeiro, assim como a capacidade de produção de granulomas (HAHN et al., 2001). O período entre a penetração das larvas e as primeiras reações hemocitárias pode variar entre as diferentes espécies de moluscos e metastrongilídeos (MONTRESOR, 2005). Quando o agente infeccioso não pode ser fagocitado, em virtude do seu tamanho, ocorre uma intensa migração de hemócitos para a área parasitada e várias camadas de células imobilizam e segregam o organismo invasor pra então eliminá-lo (MILLAR; RATCLIFF, 1994).

Embora, no presente estudo tenhamos observado a formação de granulomas ao redor das larvas de *A. cantonensis*, o desenvolvimento intramolusco desse nematoide irá ocorrer. Este fenômeno foi observado em outras espécies de moluscos infectados por diferentes Metastrongilídeos (MONTRESOR, 2005; BARÇANTE, 2006, OLIVEIRA, 2015) e, possivelmente, estão relacionados à mecanismos de escape do helminto ao sistema imune do hospedeiro.

Harris e Cheng (1975) observaram nematoides encapsulados no manto e massa cefalopediosa de *B. glabrata* infectadas com *A. cantonensis*, porém não foram observados danos histológicos em tecidos do sistema reprodutivo. Tunholi-Alves et al. (2011) também não encontraram larvas de *A. cantonensis* nos tecidos gonadais de *B. glabrata* durante o período pré-patente infecção. Nosso estudo, entretanto, evidenciou a presença de larvas de *A. cantonensis* encapsuladas na glândula de albumen e ovoteste.

Contudo, a presença de *E. paraensei* se mostrou mais prejudicial para os tecidos dos molusco, o que pode ser explicado pela intensa multiplicação assexuada deste parasito (TUNHOLI et al. 2011), que não ocorre em *A. cantonensis*. Além disso, a presença do estágio de rédias que é caracterizado pela presença de boca primitiva, faringe e intestino, permitindo que o parasito se alimente diretamente dos tecidos do hospedeiro pode causar danos teciduais intensos ao hospedeiro (FRIED; HUFFMAN, 1996).

A partir dos resultados acima referidos, é possível concluir que a co-infecção por *E. paraensei* e *A. cantonensis* induz mudanças expressivas na atividade reprodutiva de *B. glabrata*, assim como no seu metabolismo glicídico e organização tecidual do molusco hospedeiro. No entanto, alguns pontos que nos permitem a compreensão mais global dos efeitos de infecções co-ocorrentes em *B. glabrata* por *E. paraensei* e *A. cantonensis* ainda precisam ser esclarecidos, tais como o metabolismo oxidativo, de produtos nitrogenados e metabolismo inorgânico, de forma que nossos resultados atuam como ponto de partida para elaboração de estratégias para análises posteriores.

CONCLUSÃO

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

- A co-infecção experimental por *E. paraensei* e *A. cantonensis* em *B. glabrata* resultou em um processo de castração parasitária parcial em virtude da restrição de nutrientes para o processo reprodutivo do hospedeiro, em especial no grupo co-infectado E + A.
- A co-infecção experimental por *E. paraensei* e *A. cantonensis* em *B. glabrata* leva a uma redução da glicemia e, em consequência, o molusco passa a lançar mão dos estoques de glicogênio para a restauração da homeostase glicêmica.
- Apesar do mecanismo compensatório utilizado por *B. glabrata* co-infectada por *E. paraensei* e *A. cantonensis*, não é possível manter o homeostase glicêmica, o que leva o hospedeiro a aumentar a taxa de fermentação láctica, tanto para a obtenção de energia como para a reoxidação do NADH.H^+ .
- A formação de granulomas e o comprometimento de estruturas importantes para a sobrevivência dos moluscos foram decorrentes da co-infecção por *E. paraensei* e *A. cantonensis* em *B. glabrata*.
- De maneira geral, a presença de *E. paraensei* se mostrou mais prejudicial reprodutivamente, tanto nos aspectos metabólico como histológico analisados, em face da intensa multiplicação assexuada deste parasito e pela presença do estágio de rédias.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHA, P.N.; SZYFRE, S.B. Zoonoses and Communicable Diseases Man and Animals, Pan American Health Organization, Scientific and Tech. Publications, Washington, DC. 3rd edition, Vol. 1 & 2, 2003.

ADEMA, C.M.; LOKER, E.S. Specificity and Immunobiology of Larval Digenean-Snail Association. In: FRIED, B.; GRACZYK, T.K. **Advances in Trematode Biology**, 1 ed. New York: Springer, 1997. p. 229-263.

AGUIAR, P.; MORERA, P.; PASCUAL, J. First record of *Angiostrongylus cantonensis* in Cuba. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 30, p. 963-965, 1981.

ALICATA, J.E. The discovery of *Angiostrongylus cantonensis* as a cause of human eosinophilic meningitis. **Parasitology Today**, v. 7, p. 151-153, 1991.

ANDERSON, R.C. Nematode parasites of vertebrates: **Their development and transmission**. Wallingford, UK: CABI Publishing, 2000.

ASH, L.R. *Angiostrongylus michiganensis* sp. n. (Nematoda: Metastrongyloidea). A lungworm occurring in the shrew, *Sorex cinereus*, in Michigan. **Journal Parasitology**, v. 53, p. 625-629, 1968.

BANEVICIUS, N.M.S.; ZANOTTI-MAGALHÃES, E.M.; MAGALHÃES, L.A.; LINHARES, A.X. Behavior of *Angiostrongylus costaricensis* in Planorbids. **Brazilian Journal of Biology**, v. 66, p. 199-204, 2006.

BARÇANTE, T.A. Aspectos do desenvolvimento de *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Kamensky, 1905 em *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006. 179 pp.

BASCH, P.F. Intermediate host-specificity in *Schistosoma mansoni*. **Experimental Parasitology**, v. 39, p. 150-169, 1976.

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

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

BOAVENTURA, M.F.; THIENGO, S.C.; FERNANDEZ, M.A. Gastrópodes límnicos hospedeiros intermediários de trematódeos digenéticos no Brasil. In: SANTOS, S.B.;

THIENGO, S.C.; PIMENTA, A.D.; FRENANDEZ, M.A.; ABSALÃO, R.S. **Tópicos em Malacologia Ecos do XVII Encontro Brasileiro de Malacologia**. 1 ed. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Malacologia, 2007. p. 287 – 294.

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

BROCKELMAN, C.R.; SITHITHAVORN, P. Carbohydrate reserves and hemolymph sugars of the African giant snail, *Achatina fulica* in relation to parasitic infection and starvation. **Zeitschrift fur Parasitenkunde**, v. 62, p. 285 – 291, 1980.

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

CARVALHO, O.S.; DUTRA, L.V.; MOURA, A.C.M.; FREITAS, C.C.; AMARAL, R.S.; DRUMMOND, S.C.; FREITAS, C.R.; SCHOLTE, R.G.C.; GUIMARÃES, R.J.P.S.; MELO, G.R.; RAGONI, V.; GUERRA, M. Desenvolvimento de um sistema de informações para o estudo, planejamento e controle da esquistossomose no Estado de Minas Gerais. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE SENSORIAMENTO REMOTO, 2005, Goiânia. Anais XII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto. Goiânia: INPE, 2005. p. 2083-2086.

CARVALHO, O.S.; SCHOLTE, R.G.C.; MENDONÇA, C.L.F.; PASSOS, L.K.J.; CALDEIRA, R.L. *Angiostrongylus cantonensis* (Nematode: Metastrongyloidea) in molluscs from harbour areas in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n.6, p. 740-746, 2012.

CHAI, J. Echinostomes in humans. In: FRIED B, TOLEDO R, (Eds.). *The Biology of Echinostomes: From the Molecule to the Community*, New York: Springer, 2009. p. 147–84.

CHENG, T.C.; COOPERMAN, J.S. Studies of host-parasite relationships between larval trematodes and their hosts. V. The invasion of the reproductive system of *Helisoma trivolvis* by the sporocysts and cercariae of *Glythelmins pennsylvaniensis*. **Transactions of the American Microscopical Society**, v.83, p.12-23, 1964.

COGNATO, B.B.; MORASSUTTI, A.L.; SILVA, A.A.; GRAEFF-TEIXEIRA, C. First report of *Angiostrongylus cantonensis* in Porto Alegre, Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.46, p.664–665, 2013.

COMBES, C. Trematodes: antagonist between species and sterilizing effects on snails in biological control. **Parasitology**, v. 84, p. 151-175, 1982.

COWIE, R. Biology, Systematics, Life Cycle, and Distribution of *Angiostrongylus cantonensis*, the Cause of Rat Lungworm Disease. **Hawaii J Med Public Health**, v. 72, n. 6, p. 6–9, 2013.

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

CRIBB, T.H.; BRAY, R.A.; LITTLEWOOD, D.T.J. The nature and evolution of the association among digeneans, mollusks and fishes. **International Journal for Parasitology**, v. 31, p. 997-1011, 2001.

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

DE SOUZA, R.M.; GOMES, E.M.; CHAGAS, G.M.; PINHEIRO, J. The influence of starvation and *Eurytrema coelomaticum* infection on the nitrogenads products of degradation in the hemolymph of *Bradybaena similares*. **Brazilian Archives of Biology and Tecnology**, v. 43, p. 365-371, 2000.

EL-SHAZLY.; EL-HAMSHARY, E.M.; EL-SHEWY, K.M.; RIFAAT, M.M.; EL SHARKAWY, I.M. Incidence of *Parastrongylus cantonensis* larvae in different freshwater snail in Dakahlia Governorate. **Journal of Egyptian Society of Parasitology**, v. 32, p. 579-588, 2002.

ESPÍRITO-SANTO, M.C.; PINTO, P.L.; MOTA, D.J.; GRYSCHER, R.C. The first case of *Angiostrongylus cantonensis* eosinophilic meningitis diagnosed in the city of São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 55, p. 129-132, 2013.

FIOCRUZ. Casos de meningite transmitida por caramujo se espalham pelo país. Disponível em:<http://portal.fiocruz.br/pt-br/content/meningite-transmitida-por-caramujos-com-avanco-de-casos-cientistas-alertam-para-prevencao>. Publicado em 17/07/2014, Acessado 13/01/2016.

FRIED, B., HUFFMAN, J.E.(1996): The biology of the intestinal trematode *Echinostoma caproni*. *Advances in Parasitology*, 38: 311–368.

GIOVANELLI, A.; SOARES, M.S.; ANDRÉA, P.S.D.; LESSA, M.M. Abundância e infecção do molusco *Biomphalaria glabrata* pelo *Schistosoma mansoni* no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, v. 35, n. 6, p. 523-530, 2001.

GRAEFF-TEIXEIRA, C.; THOMÉ, J.W.; PINTO, S.C.C., CAMILO-MOURA, L.; LENZI, H.L. *Phylliocolis variegatus* – an intermediate host of *Angiostrongylus costaricensis* in south Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 84, p. 65-68, 1989.

GREWAL, P.S.; GREWAL, S.K.; TAN, L.; ADAMS, B.J. Parasitism of Molluscs by Nematodes: Types of Associations and Evolutionary Trends. **Journal of Nematology**, v. 35, n.2, p.146-156, 2003.

HAHN, K.R.; BENDER, R.C.; BAYNE, C.J. Involvement of nitric oxide in killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes from resistant *Biomphalaria glabrata*. **Journal of Parasitology**, v. 187, p. 778-785, 2001.

HARRIS, K.R.; CHENG, T.C. The encapsulation process in *Biomphalaria glabrata* experimentally infected with metastrongylid *Angyonstrongylus cantonensis* light microscopy. **International Journal for Parasitology**, v. 5, p. 521–528, 1975.

HEYNEMAN, D.; UMATHEVY, T. Interaction of trematodes by predation within natural double infections in the host snail *Indoplanorbis exustus*. **Nature**, v. 217, p. 283-285, 1968.

HIDELARATCHI, M.D.; RIFFSY, M.T.; WIJESKERA, J.C. A case of eosinophilic meningitis following monitor lizard meat consumption, exacerbated by anthelmintics. **Ceylon Medical Journal**, v. 50, p. 84-86, 2005.

HUNG, T.P.; CHEN, E.R. Angiostrongyliasis (*Angiostrongylus cantonensis*). **Handbook of clinical Neurology**, v. 52, p. 545 – 562, 1988.

JOHNSON, P.T.J.; BULLER, I.D. Parasite competition hidden by correlated coinfection: using surveys and experiments to understand parasite interactions. **Ecology**, v. 92, n. 3, p. 535-541, 2011.

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

KANEV, I.; STERNER, M.; RADEV, V.; FRIED, B. An overview of the biology of echinostomes. In: FRIED, B.; GRACZYK, T.K. (Eds). **Echinostomes as Experimental**

Models for Biological Research. Kluwer Academic Publishers: Netherlands, 2000 p. 1-29.

KIM, D.Y.; STEWART, T.B.; BAUER, R.W.; MITCHELL, M. *Parastrongylus* (= *Angiostrongylus*) *cantonensis* now endemic in Louisiana wild- life. **Journal of Parasitology**, v. 88, p. 1024-1026, 2002.

LELES, D.; CASCARDO, P.; FREIRE, A.S.; MALDONADO, A.; SIANTO, L.; ARAÚJO, A. Insights about echinostomiasis by paleomolecular diagnosis. **Parasitology International**, v. 63, n. 4, p. 646-649, 2014.

LIE, K.J. Swellengrebel lecture survival of *Schistosoma mansoni* and other trematode larvae in the snail *Biomphalaria glabrata*. A discussion of the interference theory. **Tropical and Geographical Medicine**, v. 34, p.111-122, 1982.

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

LIE, K.J.; HEYNEMAN, D.; RICHARDS, C.S. Studies on resistance in snails: interference by non-irradiated echinostome larvae with natural resistance to *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*. **The Journal of Invertebrate Pathology**, v. 29, p. 118-125, 1977.

LIM, H.K.; HEYNEMAN, D. Intramolluscan Inter-trematode Antagonism: a Review of Factors Influencing the Host-parasite System and its Possible Role in Biological Control. **Advances in Parasitology**, v. 10, p. 191-268, 1972.

LIMA, A.R.M.C.; MESQUITA, S.D.; SANTOS, S.S.; AQUINO, E.R.P.; ROSA, L.R.S.; DUARTE, F.S.; TEIXEIRA, A.O.; COSTA, Z.R.S.; FERREIRA, M.L.B. Alicata disease: neuroinfestation by *Angiostrongylus cantonensis* in Recife, Pernambuco, Brazil. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 67, p. 1093-1096, 2009.

LIMA, L.C.; MASSARA, C.L.; SOUZA, C.P.; VIDIGAL, T.D.; LENZI, H.L.; CARVALHO, O.S. Susceptibilidade de planorbídeos da região metropolitana de Belo Horizonte, MG (Brasil) ao *Angiostrongylus costaricensis* (Nematoda: Angiostrongylidae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 34, p. 399-402, 1992.

MALDONADO JR, A.; SIMÕES, R.O.; OLIVEIRA, A.P.M.; MOTTA, E.M.; FERNANDEZ, M.A.; PEREIRA, Z.M.; MONTEIRO, S.S.; TORRES, E.J.L.; THIENGO, S.C. First report of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongylidae) in *Achatina fulica* (Mollusca: Gastropoda) from Southeast and South Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n.7, p. 938-941, 2010.

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

MALDONADO JR., A.; LOKER, E.S.; MORGAN, J.A.T.; REY, L.; LANFREDI, R.M. Description of the adult worms of a new brazilian isolate of *Echinostoma paraensei* (Platyhelminthes: Digenea) from its natural vertebrate host *Nectomys squamipes* by light and scanning electron microscopy and molecular analysis. **Parasitology Research**, v. 87, n. 10, p. 840 – 848, 2001a.

MARCOGLIESE, D.J. Parasites: small players with crucial roles in the ecological theatre. **EcoHealth**, v.1, n.2, p.151-164, 2004.

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

MILLAR, D.A.; RATCLIFF, N.A. Invertebrates. In: TURNER, R.J. (Ed). **Immunology: a Comparative Approach**. Jonh Waley & Sons Ltd. 1994. pp. 29-68.

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

MINISTÉRIO DA SAÚDE - BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica** - Diretrizes técnicas: Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose (PCE) / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 2º ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde. Série A. Normas e Manuais Técnicos, 2008, 178.

MODENA, C.M.; COELHO, P.M.Z.; BARBOSA, F.S.; LIMA, W.S. Transmission of *Schistosoma mansoni* under experimental field condition using the bovine - *Biomphalaria glabrata* - bovine model. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v.35, n.1, p. 11-16, 1993.

MONTRESOR, L.C. *Angiostrongylus costaricensis* (Nematoda: Protostrongylidae): estudo da via migratória em *Omalonix matheroni* (Gastropoda: Succineidae) e análise comparativa da resposta hemocitária a desenvolvimento larvar em moluscos pulmonados. Dissertação, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2005. 99p.

MORASSUTTI, A.L.; THIENGO, S.C.; FERNANDEZ, M.; SAWANYAWISUTH, K.; GRAEFF-TEIXEIRA, C. Eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*: an emergent disease in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 4, p. 399-407, 2014.

MOREIRA, V.L.C.; GIESE, E.G.; MELO, F.T.V.; SIMOES, R.O.; THIENGO, S.C.; MALDONADO, Jr.A.; SANTO, S.J.N. Endemic angiostrongyliasis in the Brazilian Amazon: natural parasitism of *Angiostrongylus cantonensis* in *Rattus rattus* and *R. norvegicus*, and sympatric giant African land snails, *Achatina fulica*. **Acta Tropica**, v. 125, p. 90- 97, 2013.

MORERA, P. Angiostrongilíase abdominal. Um problema de saúde pública. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 21, p. 81-83, 1988.

MORLEY, N.J. Aquatic mollusks as auxiliary host for terrestrial nematode parasites: implications for pathogens transmission in a changing climate. **Parasitology**, v. 137, p. 1041-1056, 2010.

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

NOLAND, G.S., GRACZYK, T.K. (2009): Concurrent Infections of Echinostomes with Helminths and Protozoans. In: FRIED, B., TOLEDO, R. (Eds.). *The Biology of Echinostomes: From the Molecule to the Community*, New York, Springer, pp. 281 – 293.

NOMURA, S.; LIN, H.H. First clinical case of *Haemostrongylus ratti*. **Taiwan No Ikai**, v. 3, p. 589-592, 1945.

OLIVEIRA, A.P.M. Dinâmica da transmissão de *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda) em moluscos no município de São Gonçalo, RJ e Aspectos da Interação *Achatina fulica* – *A. cantonensis*. Tese de doutorado, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2015. 165p.

PARAENSE, W.L. Estado atual da sistemática dos planorbídeos brasileiros. **Arquivos do Museu Nacional**, v. 55, p. 105-128, 1975.

PEARSON, E.J.; CHENG, T.C. Studies on parasitic castration: Occurrence of a gametogenesis inhibiting factor in extracts of *Zoogonius lasius* (Trematoda). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.46, n.2, p.165-168, 1985.

PEREIRA, C.A.; MARTINS-SOUZA, R.L.; COELHO, P.M.; LIMA, W.S.; NEGRAO-CORREA, D. Effect of *Angiostrongylus vasorum* infection on *Biomphalaria tenagophila* susceptibility to *Schistosoma mansoni*. **Acta Tropica**, v. 98, p. 224-233, 2006.

PINCAY, T.; GARCÍA, L.; NARVÁEZ, E.; DECKER, O.; MARTINI, L.; MOREIRA, J.M. Angiostrongyliasis due to *Parastrongylus (Angiostrongylus) cantonensis* in Ecuador. First report in South America. **Tropical Medicine & International Health**, v. 14, 2009.

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

PINHEIRO, J.; AMATO, S.B. *Eurytrema coelomaticum* (Digenea, Dicrocoeliidae): the effect of infection on carbohydrate contents of its intermediate snail host, *Bradybaena similaris* (Gastropoda, Xanthynchidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, p. 407- 410, 1994.

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

PINHEIRO, J.; MALDONADO Jr, A.; LANFREDI, R.M. Physiological changes in *Lymnaea columella* (Say, 1818) (Mollusca, Gastropoda) in response to *Echinostoma paraensei* Lie and Basch, 1967 (Trematoda, Echinostomatidae) infection. **Parasitology Research**, v.106, n.1, p.55-59, 2009.

PROCIV, P.; SPRATT, D.M.; CARLISLE, M.S. Neuro-angiostrongyliasis: unresolved issues. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1295-1303, 2000.

PUTHIYAKUNNON, S.; CHENG, X. Angiostrongylus. In: XIAO, L.; RYAN, U.; FENG, Y. (Eds) **Biology of Foodborne Parasites**. CCR Press: New York, 2015. pp. 235-257.

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

SERRA-FREIRE, N.M. Fasciolose hepática. **Hora Veterinária**, v. 1, p. 13-19,1995.

SIANTO, L.; REINHARD, K.J.; CHAME, M.; CHAVES, S.; MENDONÇA, S.; GONÇALVES, M.L.; FERNANDES, A.; FERREIRA, L.F.; ARAÚJO, A. The finding of *Echinostoma* (Trematoda: Digenea) and hookworm eggs in coprolites collected from a

Brazilian mummified body dated 600-1200 years before present. **Journal of Parasitology**, v. 9, p. 972-975, 2005.

SILVA, L.D. Influência da exposição ao carbonato de cálcio no metabolismo de compostos orgânicos e inorgânicos em *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro de *Schistosoma mansoni*. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Goiás, Goiás, 2014. 94p.

SIMÕES, R.O.; MONTEIRO, F.A.; SANCHEZ, E.; THIENGO, S.C.; GARCIA, J.S.; COSTA NETO, S.F.; LUQUE, J.L.; MALDONADO, A. Endemic angiostrongyliasis, Rio de Janeiro, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, p. 1331–1333, 2011.

SLOM, T.J.; CORTESE, M.M.; GERBER, S.I.; JONES, R.C.; HOLTZ, T.H.; LOPEZ, A.S.; ZAMBRANO, C.H.; SUFIT, R.L.; SAKOLVAREE, Y.; CHAICUMPA, W.; HERWALDT, B.L.; JOHNSON, S. An outbreak of eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis* in travelers returning from the Caribbean. **The New England Journal of Medicine**, v. 346, p. 668-675, 2002.

SOUZA C.P.; LIMA, L.C. Moluscos de Interesse Parasitológico do Brasil, Série Esquistossomose 2ª ed., Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas René Rachou, Belo Horizonte. 1997. 79 pp.

STEWART, G.L.; UBELAKER, J.E.; CURTIS, D. Pathophysiologic alterations in *Biomphalaria glabrata* infected with *Angiostrongylus costaricensis*. **The Journal of Invertebrate Pathology**, v. 45, p. 152-157, 1985.

SUHARDONO, R. J.A.; COPEMAN, D.B.C. Biological control of *Fasciola gigantica* with *Echinostoma revolutum*. **Veterinary Parasitology**, v. 140, p. 166–170, 2006.

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

THIENGO, S.C. Helminthoses de interesse médico-veterinário transmitidas por moluscos no Brasil. In: SANTOS, S.B.; THIENGO, S.C.; PIMENTA, A.D.; FRENANDEZ, M.A.; ABSALÃO, R.S. **Tópicos em Malacologia Ecos do XVII Encontro Brasileiro de Malacologia**. 1 ed. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Malacologia, 2007. p. 287 – 294.

THIENGO, S.C.; MALDONADO, A.; MOTA, E.M.; TORRES, E.J.; CALDEIRA, R.; CARVALHO, O.S.; OLIVEIRA, A.P.; SIMÕES, R.O.; FRENANDEZ, M.A.; LANFREDI, R.M. The giant African snail *Achatina fulica* as natural intermediate host of *Angiostrongylus cantonensis* in Pernambuco, northeast Brazil. **Acta Tropica**, v. 115, p. 194-199, 2010.

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

TOLEDO, R.; ESTEBAN, J.G.; FRIED, B. Immunology and pathology of intestinal trematodes in their hosts. **Advances in Parasitology**, n. 63, p. 285–365, 2006.

TOLEDO, R.; FRIED, B. Echinostomes as experimental models for interactions between adult parasites and vertebrate hosts. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 6, p. 251 – 254, 2005.

TOLEDO, R.; FRIED, B. Helminth-Trematode: *Echinostoma*. In: MOTARJEMI, Y. (Ed) **Encyclopedia of Food Safety**, Volume 2, pp. 134-139. Waltham, M.A.: Academic Press, 2014.

TOLEDO, R.; RADEV, V.; KANEV, I.; GARDNER, S.L.; FRIED, B. History of Echinostomes (Trematoda). **Acta Parasitologica**, v. 59, n. 4, 555–567, 2014.

TOLOSA, E.M.C.; RODRIGUES, C.J.; BEHMER, O.A.; FREITAS-NETO, A.G. **Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica**, second ed. Manole, São Paulo, 2003. pp. 331.

TUNHOLI, V.M., TUNHOLI-ALVES, V.M., LUSTRINO, D., CASTRO, R.N., SANT'ANA, L.D., GARCIA, J.S., MALDONADO JR., A., DOS SANTOS, M.A., RODRIGUES, M.D., PINHEIRO, J. Aerobic to anaerobic transition in *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) infected with different miracidial doses of *Echinostoma paraensei* (Lie and Basch, 1967) by high-performance liquid chromatography. **Experimental Parasitology**, v. 133, n.4, p. 403–410, 2013.

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

TUNHOLI, V.M.; LUSTRINO, D.; TUNHOLI-ALVES, V.M.; MELLO-SILVA, C.C.; MALDONADO, A.; RODRIGUES, M.L.A.; PINHEIRO, J. Biochemical profile of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Gastropoda) after infection by *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae). **Parasitology Research**, v. 109, p. 855-891, 2011b.

TUNHOLI-ALVES, V.M.; TUNHOLI, V.M.; CASTRO, R.N.; SANT'ANA, L.D'O.; SANTOS-AMARAL, L.; DE OLIVEIRA, A.P. M.; GARCIA, J.; THIENGO, S.C.;

PINHEIRO, J.; MALDONADO, A. Activation of anaerobic metabolism in *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Gastropoda) experimentally infected by *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda, Metastrongylidae) by high-performance liquid chromatography. **Parasitology International**, v. 63, n. 1, p. 64-68, 2013.

TUNHOLI-ALVES, V.M.; TUNHOLI, V.M.; LUSTRINO, D.; AMARAL, L.S.; THIENGO, S.C.; PINHEIRO, J. Changes in the reproductive biology of *Biomphalaria glabrata* experimentally infected with the nematode *Angiostrongylus cantonensis*. **The Journal of Invertebrate Pathology**, v. 108, p. 220–230, 2011.

UBELAKER, J.E. Systematics of species referred to the genus *Angiostrongylus*. **Journal of Parasitology**, v. 72, p. 237–244, 1986.

WANG, Q. P.; WU, Z. D.; WEI, J.; OWEN, R. L.; LUN, Z. R. Human *Angiostrongylus cantonensis*: An update. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 31, n. 4, p. 389-395, 2012.

WANG, Q.P.; LAI, D.H.; ZHU, X.Q.; CHEN, X.G.; LUN, Z.R. Human angiostrongyliasis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 8, p. 621–630, 2008.

WHO. Weekly epidemiological record n° 9. World Health Organization, 2011, pp. 73-80.

WILLCOX, H.P.; COURA, J.R. Nova concepção para o método de Baermann – Moraes – Coutinho na pesquisa de larvas de nematódeos. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 84, p. 539–565, 1989.

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

YOKOGAWA, S. A new species of nematode found in the lungs of rats, *Haemostrongylus ratti* sp. nv. **Transactions of the Natural History Society of Formosa**, v. 27, p. 247 – 250, 1937.

YOUSIF, F.; LÁMMLER, G. The mode of infection with and the distribution of *Angiostrongylus cantonensis* larvae in the intermediate host *Biomphalaria glabrata*. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v. 53, p. 247-250, 1977.

8. ANEXOS

19/01/2016


Re: Helminthologia HE 1719-2015 Reviewer's Comments - Tatiane Cristina

Re: Helminthologia HE 1719-2015 Reviewer's Comments

Helminthologia

sex 06/11/2015 11:17

Para:Tatiane Cristina <tatianecdsb@hotmail.com>;

 3 anexos (2 MB)

HE 1719-2015_Rev_01_revised.docx; HE1719-2015_REv_01_comments.docx; Letter of Response_Rev_01.docx;

Dear Tatiane,

Your manuscript **HE 1719-2015** entitled: **Biological and histological changes in reproductive patterns of *Biomphalaria glabrata* experimentally co-infected by *Echinostoma paraense* and *Angiostrongylus cantonensis*** has been re-reviewed. Please find attached the comments made by the reviewer, revised ms and your rebuttal letter with attached comments.

Please reply in detail on first comment in (problems with Table1) as well as on commentaries in the text and your Rebuttal Letter. Make corrections where appropriate. Thank you.

We look forward to receiving your revised manuscript and again .

Best regards,

Slavka Barlak
Handling Editor

Helminthologia

--

HELMINTHOLOGIA



Editorial Office
Institute of Parasitology, Slovak Academy of Sciences
Hlinkova 3
040 01 Košice
Slovak Republic
Tel: +421 55 63 314 11-13
Fax: +421 55 63 314 14
E-mail: helminth@saske.sk

1 **Biological and histological changes in reproductive patterns of *Biomphalaria glabrata***
2 **experimentally co-infected by *Echinostoma paraensei* and *Angiostrongylus cantonensis***

3
4 Tatiane Cristina dos Santos Bonfim^a, Vinícius Menezes Tunholi-Alves^a, Florence Gonçalves Martins^a, Ester
5 Maria Mota^b, Arnaldo Maldonado Jr.^c, Juberlan Silva Garcia^c, Jairo Pinheiro^d

6
7 *a* Curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR-
8 465-km 7, CEP 23890-000 Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil

9 *b* Laboratório de Patologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Av. Brazil 4365, CEP 21040-30 Rio de
10 Janeiro, Brazil

11 *c* Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, Instituto Oswaldo Cruz,
12 Fiocruz, Av. Brazil 4365, CEP 21040-30 Rio de Janeiro, Brazil

13 *d* Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de
14 Janeiro, BR-465-km 7, CEP 23890-000 Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil

15
16 **Summary**

17 Investigation of co-infection by different helminths can provide essential information about the biology of
18 their co-existence. This study aimed to investigate the reproductive and histological changes of *Biomphalaria*
19 *glabrata* experimentally co-infected with *Echinostoma paraensei* and *Angiostrongylus cantonensis*. Five
20 groups of snails i.e. uninfected, with single and double infections, either *E. paraensei* first (E+A) or *A.*
21 *cantonensis* first (A+E) were followed; three times a week during four weeks the numbers of egg masses,
22 eggs and hatched snails were counted. Histological analysis of the ovotestis and albumen gland was
23 performed after four weeks. The number of egg masses/snail, eggs/snail and hatched snails showed
24 significative differences comparing the control group to all infected groups, especially in group E + A, with
25 the majority of values of parameters analyzed lower than 50% of those observed for control snails. The
26 histological analysis showed that presence of both parasites in the reproductive organs was associated with
27 cell disorganization.

28
29 **Key Words:** Co-infection, *Angiostrongylus cantonensis*, *Echinostoma paraensei*, *Biomphalaria glabrata*,
30 reproductive biology, histological damages.

31

32

33 **1. Introduction**

34 Gastropods are important organisms in human and veterinary medicine, acting as intermediate hosts
35 of several parasites, such as trematodes and nematodes. Among the different species, the planorbid
36 *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 has received particular attention, as the main host in the transmission of
37 *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 (WHO, 2011). Currently, this snail species is used experimentally as an
38 intermediate host in the life cycle of the nematode *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935), the main agent
39 of human eosinophilic meningoencephalitis (Wang et al., 2008), besides acting as a natural intermediate host
40 of *Echinostoma paraensei* (Lie and Basch, 1967), a trematode that causes echinostomiasis in humans and
41 wild rodents (Toledo et al., 2006).

42 The excellent adaptability of this snail species in tropical regions such as Brazil (Paraense, 1975)
43 shows the possibility of spread of these helminths and the diseases they cause to humans and animals in these
44 regions (Mostafa, 2007; Mello-Silva et al., 2010). Furthermore, according to Morley (2010) many terrestrial
45 nematodes species have the ability of using also aquatic mollusks as host under natural conditions, and it is
46 closely related with the high host-parasite physiological compatibility.

47 In Brazil, the first human case of eosinophilic meningoencephalitis was identified in 2006 (Caldeira et
48 al., 2007). Of a total 84 suspected human cases of the disease caused by *A. cantonensis*, 34 have been
49 confirmed by diagnosis (Morassutti et al., 2014). Echinostomiasis is transmitted by the ingestion of snails,
50 crustaceans, fish, amphibians and reptiles, in raw or undercooked form. Today human infection is endemic in
51 Southeast Asia and the Far East, and has been reported more recently in other regions of the World (Chai,
52 2009).

53 These facts have prompted research to shed more light on the relationship between *B. glabrata* and *A.*
54 *cantonensis* (Tunholi-Alves et al., 2011) and *B. glabrata* and *E. paraensei* (Tunholi et al., 2011), to better
55 understanding the host-parasite interactions. According to the results found in the literature, these parasites'
56 infection results in significant physiological and reproductive disorders in the host, with involvement of
57 adaptive mechanisms favorable to the host snail's survival and development of the parasite.

58 Helminth infections can affect the reproductive patterns of the intermediate host in two different
59 ways, increasing or decreasing the reproductive capacity. These phenomena are known as compensation
60 fertility (Minchella, 1985) and parasitic castration (Baudoin, 1975), respectively.

61 In a recent study, Bonfim et al. (2014) emphasized the possible occurrence of the co-infection
62 investigated here in natural conditions, since both parasites share similar biological characteristics, especially

63 the use of snails as intermediate hosts and rodents as definitive hosts. Another important aspect is the
64 occurrence of this gastropod in places where natural infection of rodents by *A. cantonensis* and *E. paraensei*
65 has been recorded.

66 Thus, to add to the information reported by Bonfim et al. (2014), this study aimed to evaluate
67 reproductive activity of *B. glabrata* experimentally co-infected by *A. cantonensis* and *E. paraensei*. In
68 addition, histopathological aspects were analyzed during the pre-patent period of the infection, enabling
69 better understanding the snail response.

70

71 **2. Materials and methods**

72 *2.1. Infective parasite forms*

73 The isolate of *E. paraensei* used was obtained from naturally infected specimens of the wild rodent
74 *Nectomys squamipes*, captured in Sumidouro, RJ, Brazil in 2001 (22°02'46''S, 42°41'21''W). The life cycle
75 has been maintained in the Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios –
76 LABPMR (IOC), Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Rio de Janeiro, using hamsters (*Mesocricetus*
77 *auratus*) as the definitive host and *B. glabrata* as the first and second intermediate hosts.

78 Adult hamsters infected with *E. paraensei* were euthanized in a CO₂ chamber (this part of the study
79 was approved by the FIOCRUZ ethics committee on animal use - LW-51/14). The adult worms were
80 collected from the small intestine and transferred to Petri dishes containing a 0.9% NaCl solution. The
81 helminths' uteruses were dissected to release eggs, which were washed and incubated in dechlorinated water
82 at 26 °C for 14 days. After this period, they were exposed to incandescent lamp (100 W, 127 V) to stimulate
83 hatching of miracidia (Pinheiro et al., 2004; Maldonado et al., 2001).

84 The specimens of *A. cantonensis* used in this study were obtained from naturally infected *Achatina*
85 *fulica* snails captured in São Gonçalo, RJ, Brazil in 2011 (22°48'26.7''S, 43°00'49.1''W). The cycle of this
86 parasite had been maintained in the LABPMR using *Rattus norvegicus* as definitive host and *B. glabrata* as
87 intermediate host. This phase of the experiment was approved by the FIOCRUZ ethics committee on animal
88 use (LW 47/14). The first-stage larvae (L₁) were obtained by collecting and processing the feces of
89 experimentally infected rodents (Willcox and Coura, 1989).

90 *2.2. Experimental infection of B. glabrata and formation of groups*

91 *Biomphalaria glabrata* (8–10 mm shell diameter), reared under laboratory condition, were divided into
92 five groups, each containing 20 snails. A control group was established with uninfected snails. Group A
93 contained snails individually infected by exposure to 1200 L₁ of *A. cantonensis* for 48 h, and group E was
94 individually exposed to 20 *E. paraensei* miracidia for 24 h. In group A + E, the initial infection was by *A.*

95 *cantonensis* and one week later the group was exposed individually to *E. paraensei* miracidia as described
96 above. Group E + A was individually infected with *E. paraensei* and one week later was exposed to *A.*
97 *cantonensis*. This procedure was performed in duplicate (n=2).

98 After the experimental infection, the snails were maintained in plastic tanks (22 cm long by 14.5 cm
99 wide and 12.5 cm in height) containing 3 L of dechlorinated water (changed every 2 weeks) with temperature
100 about $28 \pm 1^\circ\text{C}$, ambient light conditions, fed with fresh lettuce (*Lactuca sativa*) and two polystyrene plates
101 measuring 4 cm x 4 cm until the end of the experiment, at four weeks. Dead snails were removed and
102 replaced during the experiment by specimens submitted to the same experimental conditions, being
103 maintained the number of 20 snails in each aquarium during all period analyzed.

104 The infection of all the snails used in this study was confirmed as described by Bonfim et al. (2014)
105 showing an infectivity rate above 95% for *A. cantonensis* and no detecting *E. paraensei* miracia remaining in
106 the plates.

107

108 2.3. Analysis of the snails' reproductive biology

109 Three times a week during four weeks after exposure, the polystyrene plates were removed from the
110 aquaria and the number of egg masses and eggs were counted, in the latter case under a stereoscopic
111 microscope. Afterward, the plates were individually identified and placed in new aquariums free of snails.
112 The egg masses were observed weekly thereafter to count the number of hatched eggs. The number of dead
113 snails was counted three times a week, and the mortality was expressed in percentage (%). The viability
114 expressed in percentage (%), is the number of snails hatched divided by the number of eggs laid, multiplied
115 by 100.

116

117

118 2.4. Histological analysis

119 Three snails from each group were dissected after four weeks to remove the soft parts, which were
120 placed in Carson's Millonig formalin fixative for 24 h. Then, the material was dehydrated with increasing
121 concentrations of ethanol, cleared with xylol and embedded in liquid paraffin at 60°C (Tolosa et al., 2003).
122 Inclusion was performed to allow the observation of longitudinal sections of the snail body structure in the
123 histological slides. Serial 5- μm -thick slices were obtained using a Leica RM2125 microtome. The material
124 was stained with hematoxylin-eosin (HE). The histological slides were observed under a Axioskop Zeiss light
125 microscope, and images were acquired using a Zeiss Axio Cam HRc camera and processed by the Axio
126 Vision Rel. 4.7 software.

127 2.5. Statistical analysis

128 The reproductive data were expressed as mean \pm standard error and were compared infected vs. control
129 (uninfected snails) using Dunnett multiple comparison test ($\alpha = 5\%$) (InStat, GraphPad, v.4.00, Prism,
130 GraphPad, v.3.02, Prism Inc.).

131

132 **3. Results**

133 The number of egg masses/snail showed a significative reduction in the infected groups when
134 compared to the control (Table 1). There was a decrease of 52.24% in the number of egg masses/snail in the
135 E + A group compared to the control.

136 The number of eggs/egg mass in infected groups did not differ significantly from the control group
137 (Table 1).

138 A significant decrease was observed in the number of eggs/snail in all infected groups compared to
139 control. The greatest reduction was observed in the co-infected group E + A showing a reduction of 61.14%
140 (Table 1).

141 There also was a significant decrease in the number of hatched snails in the co-infected groups
142 compared to the control (Table 1). The greatest reduction was 72.97% in the E+A group compared with the
143 negative control.

144 The mortality was higher among the groups infected with *A. cantonensis* compared with the control
145 group, being higher in the group E + A (Table 1). Was observed a viability of 82.74% to control (uninfected)
146 snails. The values of viability obtained to the other groups were all lower than that observed to the control
147 group (A=67.00%; E=70.89%; E+A=46.12%), except to the group A+E to whom the viability was 88.55%.

148 *Angiostrongylus cantonensis* larvae were mainly observed in the cephalopedal mass, tentacles and
149 intestinal wall, but also were found in the heart, kidney, ovotestis, digestive gland and around the prostatic,
150 nidamental and albumen glands. The presence of *E. paraensei* was observed more frequently in the digestive
151 gland and ovotestis and more rarely in the intestinal wall, tentacles, kidney and heart.

152 Thus, the presence of both parasite developmental stages was verified in the ovotestis (Figure 1) and in
153 albumen gland (Figure 2), organs associated with reproductive activity.

154 Intense tissue disorder was verified in the infected snails, although the trematode presence was more
155 harmful. However, *A. cantonensis* larvae were associated with numerous granulomatous reactions with
156 intense inflammatory infiltrate.

157

158

159 **4. Discussion**

160 The co-infection with *E. paraensei* and *A.cantonensis* caused changes in reproductive performance and
161 tissue organization of the snails. We observed a reduction in reproductive output in the infected groups, most
162 notably in the group exposed first to *E. paraensei* and then to *A. cantonensis*. Although the reproductive
163 profile reported by Tunholi-Alves et al. (2011), who studied *B. glabrata*-*A.cantonensis*, noted a continuous
164 reduction in reproductive parameters, but without reproductive activity interruption. Tunholi et al. (2011)
165 who found reproductive compensation in *B. glabrata* infected with *E. paraensei* miracidia.

166 Our results evidence a marked reducing at the ratio of eggs *per* snails as well as at the hatched snails in
167 all exposed mollusks, in the E+A group, so we could suggest that behavior is closely related to the
168 maintenance of both trematode and nematode parasites into the host. Bonfim et al (2014) showed that co-
169 infection lead to competition between parasites and host for nutrients. Consequently, the host cannot store
170 galactogen, the main source for eggs formation.

171 Alterations were observed in co-infections with the participation of *Echinostoma* sp., and depend on the
172 species and isolate of both, host and parasite, also were influenced by the interval between exposures (Noland
173 and Graczyk, 2009).

174 Evidence suggests that interactions between co-occurring parasites can influence the host pathology in
175 the transmission of the parasite and the evolution of virulence (Johnson and Buller, 2011). Indeed, co-
176 infection is a condition that commonly occurs in nature, since usually hosts are found with multiple
177 infections.

178 *Echinostoma* rediae formation was observed in the complex digestive gland of *B. glabrata*
179 experimentally infected after 7 days (Bonfim et al., 2014). The rediae stage is characterized by the presence
180 of a primitive mouth, pharynx and intestine, allowing the parasite to feed directly from host tissues (Fried and
181 Huffman, 1996). The sequence of this co-infection occurred one week apart, so the formation of *E. paraensei*
182 rediae coincided with the penetration and migration of the *A. cantonensis* larvae in the snails, possibly
183 explaining the greater impairment of the reproduction in the E + A co-infected group.

184 Bonfim et al. (2014) analyzed biochemical parameters of *B. glabrata* co-infected with *A. cantonensis*
185 and *E. paraensei* and observed a decrease in concentration of total protein, accumulation of nitrogen
186 excretion products and increased activity of aminotransferases in the hemolymph, indicating metabolic
187 changes in the protein/nitrogenous products of degradation and excretion metabolism of the host.

188 Harris and Cheng (1975) observed encapsulated nematodes in the mantle and cephalopedal mass of *B.*
189 *glabrata* infected with *A. cantonensis*, but there were no histological damages in reproductive system tissues.
190 Tunholi-Alves et al. (2011) also did not find *A. cantonensis* larvae in the gonadal tissues of *B. glabrata*

191 during the prepatent infection period. Our study, however, evidenced the presence of *A. cantonensis* larvae
192 encapsulated in the ovotestis and albumen gland. Although, the presence of *E. paraensei* was more damaging
193 to snail tissues, a finding that can be explained by the intense asexual multiplication of this parasite (Tunholi
194 et al., 2011), which not occur in *A. cantonensis*.

195 We observed histological changes in the reproductive structures along with metabolic stress caused by
196 parasitism. These modifications were most evident in co-infected snails, showing the reduction of
197 reproductive activity, triggered by the host's attempt to maintain homeostasis to preserve physiological
198 functions.

199

200 **Acknowledgments**

201 This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
202 (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação Carlos
203 Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ). We also thank Sandra Alves
204 Telles, Andre Santana and Rodrigo Mexas for their support.

205

206 **References**

- 207 BAUDOIN, M. (1975): Host castration as a parasitic strategy. *Evolution*, 29: 335–352.
- 208 BONFIM, T.C.S., MALDONADO Jr., A., TUNHOLI, V.M., TUNHOLI-ALVES, V.M., FARO, M.J.,
209 MOTA, E.M., SILVA, T.C.B., PINHEIRO, J., GARCIA, J.S. (2014): Biochemical and histopathological
210 alterations in *Biomphalaria glabrata* due to co-infection by *Angiostrongylus cantonensis* and *Echinostoma*
211 *paraensei*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 115: 80-85
- 212 CALDEIRA, R.L., MENDONÇA, C.L.G.,GOVEIA, C.O.,LENZI, H.L.,GRAEFF-TEIXEIRA, C., LIMA,
213 W.S., MOTA, E.M.,PECORA, I.L., MEDEIROS, A.M.Z, CARVALHO, O.S. (2007): First record of
214 molluscs naturally infected with *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) (Nematoda: Metastrongylidae) in
215 Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102: 887-889.
- 216 CHAI, J. (2009): Echinostomes in humans. In: FRIED B, TOLEDO R, (Eds.). *The Biology of Echinostomes:*
217 *From the Molecule to the Community*, New York: Springer, pp. 147–84.
- 218 FRIED, B., HUFFMAN, J.E.(1996): The biology of the intestinal trematode *Echinostoma caproni*. *Advances*
219 *in Parasitology*, 38: 311–368.
- 220 HARRIS, K.R., CHENG, T.C. (1975): The encapsulation process in *Biomphalaria glabrata* experimentally
221 infected with metastrongylid *Angyonstrongylus cantonensis* light microscopy. *International Journal for*
222 *Parasitology*, 5: 521–528.
- 223 JOHNSON, P.T.J., BULLER, I.D. (2011): Parasite competition hidden by correlated coinfection: using
224 surveys and experiments to understand parasite interactions. *Ecology*, 92 (3):535-541.

- 225 MALDONADO Jr, A., VIEIRA, G.O., GARCIA, J.S., REY, L., LANFREDI, R.M. (2001): Biological
226 aspects of a new isolate of *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae): susceptibility of
227 sympatric snails and the natural vertebrate host. *Parasitology Research*, 87: 853–859.
- 228 MELLO-SILVA, C.C., VILAR, M.M., VASCONCELLOS, M.C., PINHEIRO, J., RODRIGUES, M.L.A.
229 (2010): Carbohydrate metabolism alterations in *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni*
230 and exposed to *Euphorbia splendens* var. *hislopilii* látex. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105: 492–495.
- 231 MINCHELLA, D.J. (1985): Host-history variation in response to parasitism. *Parasitology*, 90: 205-216.
- 232 MORASSUTTI, A.L., THIENGO, S.C., FERNANDEZ, M., SAWANYAWISUTH, K., GRAEFF-
233 TEIXEIRA, C. (2014): Eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*: an emergent disease
234 in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 109(4): 399-407.
- 235 MORLEY, N.J. (2010) Aquatic mollusks as auxiliary host for terrestrial nematode parasites: implications for
236 pathogens transmission in a changing climate. *Parasitology*, 137: 1041-1056.
- 237 MOSTAFA, O.M.S. (2007): Effects of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium* infections on
238 calcium content in their intermediate hosts. *Parasitology Research*, 101: 963–966.
- 239 NOLAND, G.S., GRACZYK, T.K. (2009): Concurrent Infections of Echinostomes with Helminths and
240 Protozoans. In: FRIED, B., TOLEDO, R. (Eds.). *The Biology of Echinostomes: From the Molecule to the*
241 *Community*, New York, Springer, pp. 281 – 293.
- 242 PARAENSE, W.L. (1975): Estado atual da sistemática dos planorbídeos brasileiros. *Arquivos do Museu*
243 *Nacional*, 55: 105–128.
- 244 PINHEIRO, J., MALDONADO JR., A., LANFREDI, R.M. (2004): Light and scanning electron microscopy
245 of the miracidium of *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae). *Veterinary Parasitology*, 121:
246 265–275.
- 247 TOLEDO, R., ESTEBAN, J.G., FRIED, B. (2006): Immunology and pathology of intestinal trematodes in
248 their hosts. *Advances in Parasitology*, 63: 285–365.
- 249 TOLOSA, E.M.C., RODRIGUES, C.J., BEHMER, O.A., FREITAS-NETO, A.G., (2003): *Manual de*
250 *Técnicas para Histologia Normal e Patológica*, second ed. Manole, São Paulo, pp. 331.
- 251 TUNHOLI, V.M., LUSTRINO, D., TUNHOLI-ALVES, V.M., MELLO-SILVA, C.C.C., MALDONADO
252 JR., A., RODRIGUES, M.L.A., PINHEIRO, J. (2011): Changes in the reproductive biology of *Biomphalaria*
253 *glabrata* infected with different doses of *Echinostoma paraensei* miracidia. *Journal of Invertebrate*
254 *Pathology*, 106: 192–195.
- 255 TUNHOLI-ALVES, V.M., TUNHOLI, V.M., LUSTRINO, D., AMARAL, L.S., THIENGO, S.C.,
256 PINHEIRO, J. (2011): Changes in the reproductive biology of *Biomphalaria glabrata* experimentally
257 infected with the nematode *Angiostrongylus cantonensis*. *The Journal of Invertebrate Pathology*, 108: 220–
258 320.
- 259 WANG, Q.P., LAI, D.H., ZHU, X.Q., CHEN, X.G., LUN, Z.R. (2008): Human angiostrongyliasis. *The*
260 *Lancet Infectious Diseases*, 8: 621–630.

- 261 WHO, 2011. Weekly epidemiological record n° 9. World Health Organization, pp. 73-80.
- 262 WILLCOX, H.P., COURA, J.R. (1989): Nova concepção para o método de Baermann – Moraes – Coutinho
263 na pesquisa de larvas de nematódeos. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 84: 539–565.
264

Table 1:

Effects in the reproduction and mortality of *Biomphalaria glabrata* co-infected with *Angiostrongylus cantonensis* and *Echinostoma paraensei*. Data expressed as mean \pm standard error. n=2.

Group	Egg masses/snail	Egg/Egg mass	Eggs/snail	Hatched snails	Mortality (%)
Control	0.67 \pm 0.11 ^a	11.29 \pm 0.53 ^a	7.54 \pm 1.36 ^a	249.54 \pm 49.70 ^a	25
A	0.33 \pm 0.06 ^b	10.62 \pm 1.36 ^a	3.72 \pm 0.80 ^b	99.69 \pm 24.09 ^b	27.5
E	0.36 \pm 0.08 ^b	9.20 \pm 0.69 ^a	3.53 \pm 0.74 ^b	94.85 \pm 23.74 ^b	20
A+E	0.38 \pm 0.07 ^b	8.48 \pm 0.69 ^a	3.66 \pm 0.89 ^b	103.54 \pm 30.76 ^b	30
E+A	0.32 \pm 0.07 ^b	9.54 \pm 0.62 ^a	2.93 \pm 0.62 ^b	67.46 \pm 15.44 ^b	32.5

^{a, b, c} Groups with different superscripts differ significantly ($\alpha = 5\%$).

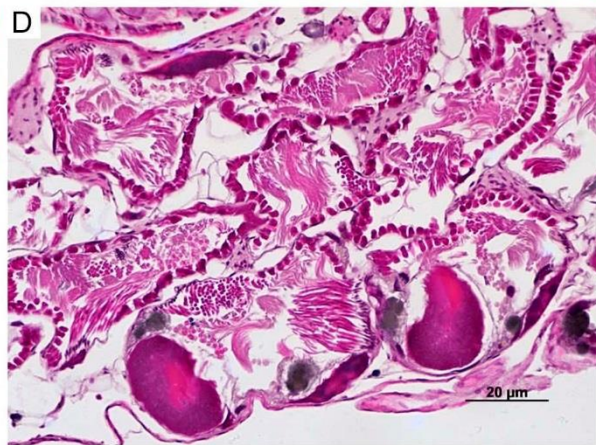
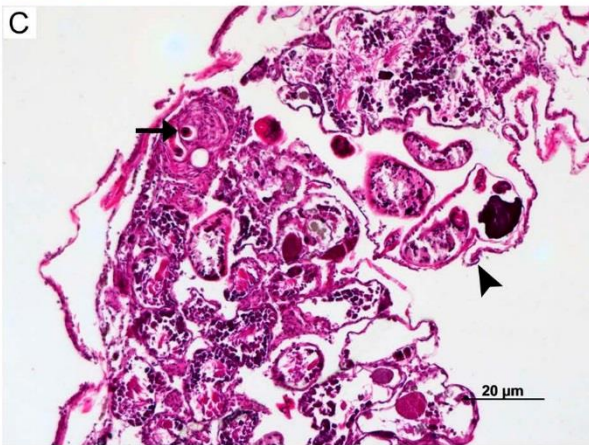
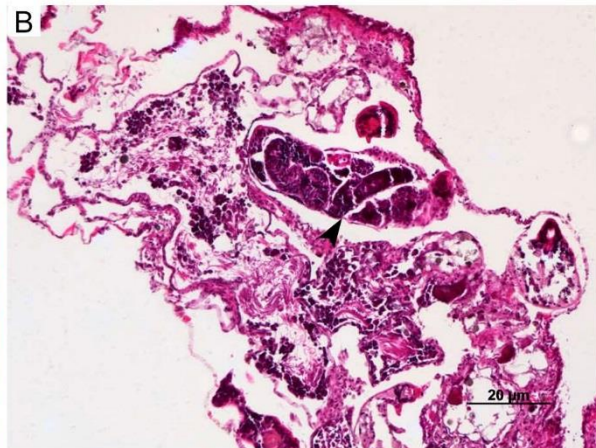
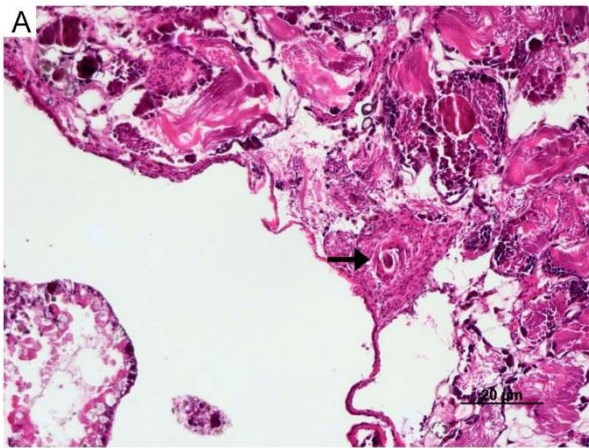


Figure 1. Histological section of *Biomphalaria glabrata* ovotestis experimentally co-infected with *Echinostoma paraense* () and *Angiostrongylus cantonensis* (). (A) Section of a snail infected with *A. cantonensis* showing the presence of a perilarvar granuloma and functionally active ovotestis region, with the structure of the acinus containing grouped sperm. Scale bar = 20 μ m. (B). Section from a snail infected by *E. paraense* showing the presence of rediae in the ovotestis and a grouping of sperm. Scale bar = 20 μ m. (C). Section of a co-infected snail showing developmental stages of both parasites, with intense tissue disorganization. Scale bar =20 μ m. (D) Section from a control snail showing the region containing acinus with oocytes, sperm and greater tissue preservation. Scale bar =20 μ m.

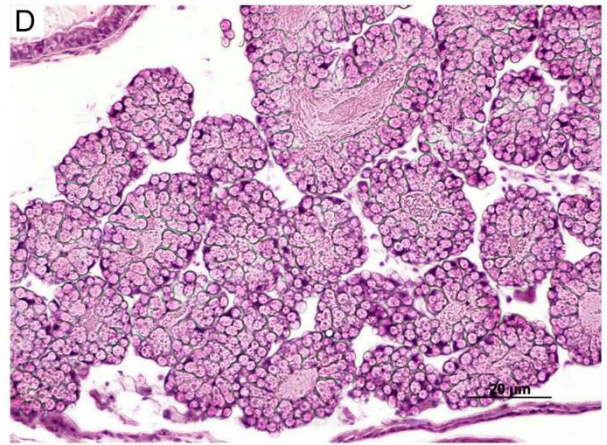
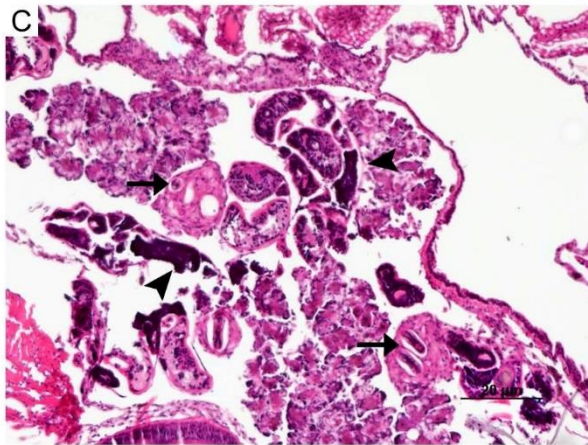
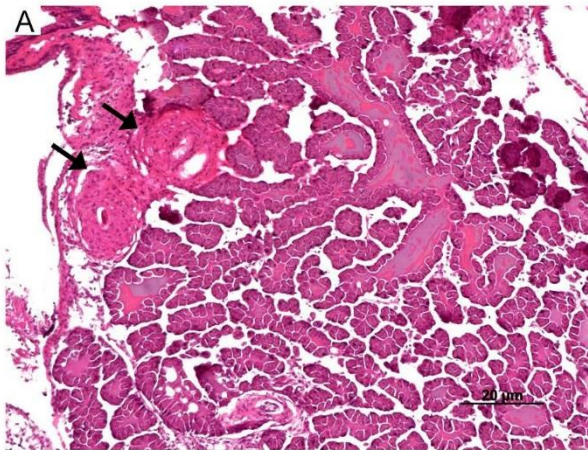


Figure 2: Histological section of *Biomphalaria glabrata* albumen gland experimentally co-infected with *Echinostoma paraensei* () and *Angiostrongylus cantonensis* (). (A) Section of a snail infected with *A. cantonensis* showing the presence of a perilarvar granuloma and preserved acinus structure. Scale bar = 20 μ m. (B) Section from a co-infected snail showing the presence of rediae and larvae in the albumen gland with intense tissue disorganization. Scale bar = 20 μ m. (C) Section of a co-infected snail showing intense tissue disorganization and the developmental stages of both parasites. Scale bar = 20 μ m. (D) Section from a control snail showing the albumen gland region with