

**UFRRJ**

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

**TESE**

**CARACTERIZAÇÃO DO METABOLISMO AERÓBIO E ANAERÓBIO  
DE *Biomphalaria glabrata* (SAY, 1818) EXPERIMENTALMENTE  
INFECTADA POR *Echinostoma paraensei* (LIE e BASCH, 1967)**

**VICTOR MENEZES TUNHOLI ALVES**

2015



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

**CARACTERIZAÇÃO DO METABOLISMO AERÓBIO E ANAERÓBIO  
DE *Biomphalaria glabrata* (SAY, 1818) EXPERIMENTALMENTE  
INFECTADA POR *Echinostoma paraensei* (LIE e BASCH, 1967)**

**VICTOR MENEZES TUNHOLI ALVES**

*Sob a Orientação da Professora Doutora  
**Maria de Lurdes de Azevedo Rodrigues**  
e Co-orientação do Professor Doutor  
**Jairo Pinheiro da Silva***

Tese submetida como requisito parcial  
para obtenção do grau de **Doutor em  
Ciências**, no curso de Pós-Graduação  
em Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ  
Outubro de 2015

636.089696

A474c

T

Alves, Victor Menezes Tunholi,  
1985-

Caracterização do metabolismo aeróbio e anaeróbio de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) experimentalmente infectada por *Echinostoma paraensei* (Lie e Basch, 1967) / Victor Menezes Tunholi Alves - 2015.

88 f.: il.

Orientador: Maria de Lurdes de Azevedo Rodrigues.

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

Bibliografia: f. 78-88.

1. Parasitologia veterinária - Teses. 2. *Biomphalaria glabrata* - Teses. 3. Trematódeo - Teses. 4. Homeostase - Teses. 5. Relação hospedeiro-parasito - Teses. I. Rodrigues, Maria de Lurdes de Azevedo, 1955-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

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

**VICTOR MENEZES TUNHOLI ALVES**

Tese submetida ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências Veterinária**.

TESE APROVADA EM 16/10/2015.

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Maria de Lurdes de Azevedo Rodrigues, UFRRJ.  
(Orientadora)

---

Prof<sup>º</sup>. Dr. Eduardo José Lopes Torres, UERJ.

---

Dra. Clélia Christina Corrêa de Mello-Silva, FIOCRUZ.

---

Dr. Juberlan Silva Garcia, FIOCRUZ.

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Isabele da Costa Angelo, UFRRJ.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que trilhou ao meu lado toda essa trajetória e de toda minha vida, foi Apoio nas horas difíceis, foi Base nos momentos em que desanimei, foi Luz quando tudo parecia impossível, foi Amigo quando precisei chorar, foi Irmão quando me senti órfão, foi Alegria quando tudo deu certo, foi Deus quando eu sabia que mais nada dependia de mim e principalmente foi Amor, nos momentos felizes e tristes.

Aos meus pais, José Nilo e Sueli, que viveram comigo cada etapa da minha vida, me incentivando, educando, vibrando comigo nas minhas, ou melhor, nas nossas conquistas e sofrendo comigo quando tudo parecia tão difícil. Pela presença, mesmo quando eu estava longe. Por todas as renúncias e alegrias, meu amor e gratidão eternos.

A minha querida irmã Lívia e Vovó Eunice que sempre me apoiaram em cada etapa da minha vida, me ajudando e incentivando em tudo.

A professora e orientadora Profa. Dra. Maria de Lurdes de Azevedo Rodrigues, DPA, IV, UFRRJ, pelo incentivo e confiança depositados em mim durante esse período, compartilhando comigo seus ensinamentos e amizade. O meu muito obrigado por ter apostado neste desafio!

Ao meu querido co-orientador, Prof. Dr. Jairo Pinheiro da Silva, Área de Biofísica, DCFis, IB, UFRRJ, que é muito mais que isso para mim, que faz o impossível por aqueles que estão próximos, sendo para mim não só um exemplo de pesquisador e profissional, mas de integridade e generosidade. Muito obrigado por sua paciência e por todos os seus ensinamentos concedidos a mim ao longo desses anos.

Ao meu irmão e amigo Vinícius por estar presente em todas as inúmeras etapas de minha vida. Obrigado por seus conselhos e cumplicidade. Obrigado por sua dedicação ao longo dos “meus” inúmeros experimentos e durante a fase de redação desse “meu” trabalho. Sem você tudo seria muito mais difícil.

Ao professor Dr. Arnaldo Maldonado Júnior, FIOCRUZ, RJ, que me recebeu em seu respectivo laboratório, proporcionando as condições necessárias para o bom desenvolvimento da minha tese, além do carinho e atenção a mim destinados.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, DPA, IV, UFRRJ, pela disponibilidade, troca de conhecimentos e vivências, amizade e respeito, permitindo fazer parte de suas vidas e experiências.

Aos amigos de Laboratório, Fabrício Gaudêncio, Mariana Lima e Mariana Seabra, pela parceria, conversas e convivência estabelecida ao longo desses anos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), pelas bolsas que permitiram a realização dessa tese.

Quando citamos nomes, corremos o risco de esquecer alguém, e, por isso, gostaria de agradecer a todos que, embora não tenham sido mencionados, estiveram presentes comigo durante a realização deste trabalho, auxiliando e transmitindo seus conhecimentos.

## BIOGRAFIA

Victor Menezes Tunholi Alves, filho de José Nilo Alves e Sueli Menezes Tunholi Alves, nascido em 1985, no Município de Cachoeiro de Itapemirim, ES.

Realizou os estudos primário e secundário nas Escolas Municipal Antônio Acha e Guimarães Rosa, ES, respectivamente. Em abril de 2004 ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, onde exerceu cargo de monitor das disciplinas de Parasitologia II, Departamento de Parasitologia Animal (DPA), Instituto de Veterinária (IV), e de Patologia Clínica, Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária (DMCV), Instituto de Veterinária (IV). Adicionalmente, foi bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), trabalhando no estudo da Interface *Echinostoma paraensei/Biomphalaria glabrata*, sob a orientação do Prof. Dr. Jairo Pinheiro da Silva.

Graduou-se em Medicina Veterinária pela UFRRJ em setembro de 2009. Em março de 2010, ingressou no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias - Parasitologia Veterinária da UFRRJ. Em fevereiro de 2012, foi condecorado com título de Mestre em Ciências Veterinárias após defesa de sua dissertação intitulada “**ALTERAÇÕES MORFO-FISIOLÓGICAS EM *Biomphalaria glabrata* SAY, 1818 (PULMONATA, PLANORBIDAE) POR INFECCÃO EXPERIMENTAL DE *Echinostoma paraensei* LIE & BASCH, 1967 (TREMATODA, ECHINOSTOMATIDAE)**” sob a orientação da Professora Doutora Maria de Lurdes de Azevedo Rodrigues e co-orientação do Professor Doutor Jairo Pinheiro da Silva. Em março de 2012, ingressou no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias - Parasitologia Veterinária da UFRRJ, em nível de Doutorado.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	2
2.1 <i>Biomphalaria</i> Preston, 1910 .....	2
2.2 <i>Echinostoma</i> spp. ....	6
2.2.1 Introdução .....	6
2.2.2 Morfologia e classificação de <i>Echinostoma paraensei</i> .....	7
2.2.3 Ciclo de vida de <i>Echinostoma paraensei</i> .....	12
2.2.4 Epidemiologia .....	15
2.2.5 Importância dos equinostomatídeos em saúde pública .....	16
2.2.6 Importância de <i>Echinostoma</i> spp. em animais silvestres e domésticos .....	17
2.3 Relação entre moluscos e larvas de helmintos .....	18
2.3.1 Aspectos sobre o metabolismo glicídico e atividade da lactato desidrogenase em moluscos infectados por larvas de helmintos .....	18
2.3.2 Alterações nas concentrações de ácidos orgânicos em moluscos submetidos a condições de estresse fisiológico.....	20
2.3.3 Alterações na fisiologia mitocondrial de moluscos submetidos a condições de estresse fisiológico.....	22
2.3.4 Alterações fisiológicas verificadas durante a interface <i>Biomphalaria glabrata</i> / <i>Echinostoma paraensei</i> .....	25
3 OBJETIVOS .....	28
4 CAPÍTULO I Transição do metabolismo aeróbio para anaeróbio em <i>Biomphalaria glabrata</i> (Say, 1818) infectadas com diferentes doses miracidiais de <i>Echinostoma paraensei</i> (Lie e Basch, 1967) por cromatografia líquida de alta eficiência .....	29
RESUMO .....	30
ABSTRACT .....	31
4.1 INTRODUÇÃO .....	32
4.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	33
4.2.1 Obtenção de miracídeos de <i>Echinostoma paraensei</i> .....	33
4.2.2 Manutenção dos moluscos e formação dos grupos .....	33
4.2.3 Obtenção de <i>Biomphalaria glabrata</i> e infecção experimental .....	34
4.2.4 Dissecção dos moluscos e coleta da hemolinfa e tecidos .....	34
4.2.5 Determinações bioquímicas de glicose, glicogênio e atividade da LDH em <i>Biomphalaria glabrata</i> infectadas por <i>Echinostoma paraensei</i> .....	35
4.2.6 Determinação dos conteúdos hemolinfáticos de ácidos carboxílicos .....	36
4.2.6.1 Preparo das soluções padrão .....	36
4.2.6.2 Análises por CLAE .....	36
4.2.7 Análises histopatológicas .....	37
4.2.8 Análises estatísticas .....	37
4.3 RESULTADOS .....	37

4.3.1 Determinação da concentração de glicose e atividade da LDH .....	37
4.3.2 Determinação da concentração de glicogênio.....	42
4.3.3 Análises da HPLC.....	45
4.3.4 Análises histopatológicas .....	47
4.4 DISCUSSÃO .....	49
4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	51
5 CAPÍTULO II FISIOLOGIA MITOCONDRIAL DE <i>Biomphalaria glabrata</i> (MOLLUSCA: GASTROPODA) APÓS INFECÇÃO POR <i>Echinostoma paraensei</i> (TREMATODA: ECHINOSTOMATIDAE .....	58
RESUMO .....	59
ABSTRACT .....	60
5.1 INTRODUÇÃO .....	61
5.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	62
5.2.1 Coleta de ovos de <i>Echinostoma paraensei</i> e obtenção dos miracídios.....	62
5.2.2 Manutenção dos moluscos e formação dos grupos .....	63
5.2.3 Obtenção de <i>Biomphalaria glabrata</i> e infecção experimental .....	63
5.2.4 Dissecção dos moluscos para coleta dos tecidos .....	64
5.2.5 Consumo de oxigênio no DGG impermeabilizado utilizando high-resolution respirometry .	64
5.2.6 Análises estatísticas .....	64
5.3 RESULTADOS .....	65
5.4 DISCUSSÃO .....	67
5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	70
6 CONCLUSÕES.....	75
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	76
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78
9 ANEXOS.....	89

## LISTA DE FIGURAS

<p>Figura 1. Figura ilustrativa de <i>Biomphalaria glabrata</i> sem a concha, vista pelo lado esquerdo. Fonte: Paraense; Deslandes,1955 .....</p>	4
<p>Figura 2. Vista lateral dos órgãos de <i>Biomphalaria glabrata</i> com o manto e o saco bucal dissecados (Figura ilustrativa). Legenda e apresentação das figuras modificada a partir dos originais. Fonte: Paraense; Deslandes (1955) .....</p>	5
<p>Figura 3. Microscopia de <i>Echinostoma</i> spp.: (A) micrografia eletrônica de varredura destacando o colar cefálico de espinhos de um exemplar adulto de <i>E. caproni</i> (barra de escala: 200 µm); (B) micrografia eletrônica de varredura de um helminto adulto de <i>E. caproni</i> demonstrando o colar de espinhos (barra de escala: 1 mm); (C) ovo de <i>Echinostoma</i> sp. recuperado de amostras fecais humanas (barra de escala: 50 µm); e (D) metacercárias de <i>Echinostoma</i> sp. coletadas a partir de espécimes de <i>Biomphalaria glabrata</i> experimentalmente infectadas (barra de escala: 75 µm). Fonte: TOLEDO; FRIED (2014) .....</p>	9
<p>Figura 4. Micrografia eletrônica de <i>Echinostoma paraensei</i> (isolado do Rio de Janeiro). Vista ventral de <i>E. paraensei</i> demonstrando a ventosa oral (os), colar peristômico (pc), acetábulo (a). <b>B</b> Vista ventral demonstrando colar peristômico e bolsa do cirro protuberada (c). Fonte:Maldonado et al. (2001) .....</p>	10
<p>Figura 5. <i>Echinostoma paraensei</i> (isolado do Rio de Janeiro). <b>a</b> parasito adulto, 28 dias de idade, <b>b</b> colar peristômico, <b>c</b> bolsa do cirro (c), vesícula seminal (sv), glândula prostática (pg) e útero terminal com ovos. Fonte: Maldonado et al. (2001) .....</p>	11
<p>Figura 6. Ciclo de vida geral de <i>Echinostoma</i> spp.: (a) helmintos adultos habitam o intestino delgado de vários hospedeiros vertebrados, incluindo humanos; (b) ovos são eliminados juntamente com as fezes do hospedeiro definitivo; (c) eclosão dos miracídios em coleções hídricas e infecção ativa em moluscos; (d) esporocistos, (e) rédias mãe e, (f) rédias filhas, são os estágios de desenvolvimento parasitário que ocorrem no interior do primeiro hospedeiro intermediário; (g) cercárias são eliminadas e nadam até localizarem e infectarem o segundo hospedeiro intermediário (moluscos, anfíbios, bivalves, peixes) na qual encistam transformando em metacercárias; (h) as metacercárias são ingeridas pelo hospedeiro definitivo e desencistam evoluindo para helmintos adultos. Fonte: TOLEDO; FRIED (2005) .....</p>	14
<p>Figura 7. Esquema que ilustra as reações que integram o ciclo do ácido cítrico. Em destaque, a reação de síntese do propionato a partir do succinato, comum em bactérias anaeróbias, mas que ocorre em gastrópodes estivados. Fonte: STRYER et al. (2004) .....</p>	22
<p>Figura 8. Esquemas que ilustram as reações que integram o ciclo do ácido cítrico e a fosforilação oxidativa em <i>Biomphalaria glabrata</i> sob condições fisiológicas. Fonte: STRYER et al. (2004) .....</p>	24

## CAPÍTULO 1

Figura 1. Relação entre a concentração de glicose, expressa em mg/dl, na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* infectadas por 5 (A) e 50 (B) miracídios de *Echinostoma paraensei* e o tempo, expresso em semanas. 0 (zero) semana de infecção representa à média dos moluscos do grupo controle dissecados após o final de cada período experimental (1, 2, 3 e 4 semanas). a, b, c = Médias diferem significativamente entre si. (média±DP)

38

Figura 2. Relação entre a atividade da lactato desidrogenase, expressa em UI, na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* infectadas por 5 (A) e 50 (B) miracídios de *Echinostoma paraensei* e o tempo, expresso em semanas. 0 (zero) semana de infecção representa à média dos moluscos do grupo controle dissecados após o final de cada período experimental (1, 2, 3 e 4 semanas). a, b, c = Médias diferem significativamente entre si. (média±DP)

42

Figura 3. Relação entre o conteúdo de glicogênio, expresso em mg de glicose/g de tecido, peso fresco), na glândula digestiva de *Biomphalaria glabrata* infectadas por 5 (A) e 50 (B) miracídios de *Echinostoma paraensei* e o tempo, expresso em semanas. 0 (zero) semana de infecção representa a média dos moluscos do grupo controle dissecados após o final de cada período experimental (1, 2, 3 e 4 semanas). a, b, c = Médias diferem significativamente entre si. (média±DP)

43

Figura 4. Relação entre o conteúdo de glicogênio, expresso em mg de glicose/g de tecido, peso fresco), na massa cefalopediosa de *Biomphalaria glabrata* infectadas por 5 (A) e 50 (B) miracídios de *Echinostoma paraensei* e o tempo, expresso em semanas. 0 (zero) semana de infecção representa a média dos moluscos do grupo controle dissecados após o final de cada período experimental (1, 2, 3 e 4 semanas). a, b, c = Médias diferem significativamente entre si. (média±DP)

43

Figura 5. Corte histológico da glândula digestiva de *Biomphalaria glabrata* corado por PAS. A e B - Secção de moluscos não infectados mostrando a integridade e funcionalidade da glândula digestiva, bem como a ausência de estágios larvais do parasito, exibindo lúmen com a presença de material amorfo (lu) e grânulos de glicogênio (gr). C, D, E e F- Corte histológico da região da glândula digestiva de moluscos experimentalmente infectados por *Echinostoma paraensei* exibindo uma região caracterizada por intensa desorganização celular decorrida pela presença de estágios de rédias (↑) e cercárias (cer), ventosa oral (os), poro de nascimento (bp), acetábulo (ac), cauda (t), extremidade anterior (ae) e posterior (pe) e a presença de grânulos de glicogênio (gr)

48

## CAPÍTULO 2

Figura 1. Fisiologia mitocondrial de *B. glabrata* após primeira (A), segunda (B), terceira (C) e quarta (D) semana de infecção por 50 miracídios de *E. paraensei*. Relação estabelecida entre o consumo de oxigênio, expressado por pmol O<sub>2</sub>/mg proteína e adições sequenciais de Malato (M) (5 mM), Piruvato (P) (5 mM), ADP (0,5 mM), Oligomicina (Oligo) (1µg/ml), FCCP (0,4 µM), Rotenona (Rot) (1 µM) e Antimicina A (Ant) (5 µM). \* = Médias diferem significativamente entre si (média±EP). Grupo controle (N=5 moluscos); grupo infectado (N=5 moluscos)

66

## LISTAS DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

- Tabela 1. Atividade da lactato desidrogenase (UI) e concentração de glicose (mg/dL) na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* infectada experimentalmente com 5 e 50 miracidios de *Echinostoma paraensei*. <sup>a, b, c</sup> = Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente em relação ao grupo controle a cada semana experimental,  $P < 0.05$ , (média±SD) ..... 40
- Tabela 2. Conteúdo de glicogênio na glândula digestiva e massa cefalopediosa, expresso em mg de glicose/g de tecido, em peso fresco, em *Biomphalaria glabrata* infectada experimentalmente com 5 ou 50 miracidios de *Echinostoma paraensei*. <sup>a, b, c</sup> = Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente em relação ao grupo controle a cada semana experimental,  $P < 0.05$ , (média±SD) ..... 44
- Tabela 3. Níveis de ácidos orgânicos na hemolinfa (mM) de *Biomphalaria glabrata* infectada com 5 e 50 miracidios de *Echinostoma paraensei*, em diferentes períodos de infecção, expressados em semanas. Semana 0 (zero) representa a média do grupo controle durante as quatro semanas de análises, uma vez que não houve diferenças significativas nestas semanas. a, b, c, d = médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente,  $P < 0.05$ , (média ± desvio-padrão). ND= ácidos orgânicos não detectados ..... 46

## RESUMO

TUNHOLI, Victor Menezes Alves. **Caracterização do Metabolismo Aeróbio e Anaeróbio de *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (Pulmonata, Planorbidae) Experimentalmente Infectadas Com Diferentes Doses Miracídias de *Echinostoma paraensei* Lie e Basch, 1967 (Trematoda, Echinostomatidae)** 2016. 101 p Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Animal). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

Parasitas pertencentes ao gênero *Echinostoma* caracterizam por apresentar um ciclo biológico complexo, com dois hospedeiros intermediários e sítio final de infecção restrito ao lúmen intestinal de seus hospedeiros definitivos. Estes hospedeiros são representados principalmente por aves aquáticas e semi-aquáticas, mamíferos, incluindo o homem, e ocasionalmente algumas espécies de répteis e peixes. Possuem como primeiros hospedeiros intermediários moluscos límnicos, onde os miracídios penetram ativamente e desenvolvem até os estágios de esporocistos, rédias e cercárias. Por sua vez, crustáceos, anfíbios, peixes e moluscos límnicos atuam como segundos hospedeiros intermediários onde ocorre a formação de metacercárias, estágios infectantes ao hospedeiro definitivo. Neste estudo, *Biomphalaria glabrata* foi experimentalmente infectada com diferentes doses miracídias (5 ou 50) de *E. paraensei*. Os moluscos foram dissecados após uma, duas, três e quatro semanas de infecção para a coleta da hemolinfa e tecidos (complexo gônada-glândula digestiva- GGD e massa cefalopediosa). Na hemolinfa foram quantificadas as concentrações de glicose e de ácidos carboxílicos (succínico, pirúvico, láctico e oxálico), bem como a atividade da lactato desidrogenase (LDH). Nos tecidos de estocagem foram mensurados os conteúdos de glicogênio e consumo de oxigênio (O<sub>2</sub>). Alterações foram observadas na glicemia dos moluscos, em ambas as situações de parasitismo, com significativo aumento dos níveis de glicose verificado a partir da terceira semana de infecção quando comparado ao grupo controle. Mudanças foram também descritas em relação à atividade da lactato desidrogenase, sendo caracterizadas pelo aumento de sua atividade nos períodos mais tardios da infecção. Em paralelo, verificou-se um decréscimo nos conteúdos de glicogênio em tecidos de armazenamento, sendo tal redução maior na glândula digestiva (sítio de desenvolvimento larval), em comparação à massa cefalopediosa. A infecção por ambas as doses miracídias ainda resultou em um aumento dos níveis de ácidos oxálico e láctico, bem como em um declínio nos conteúdos de ácidos pirúvico e succínico em *B. glabrata*. Significativa supressão no estado fosforilativo (estado 3 respiratório) e no consumo basal de oxigênio (estado 1 e 2) em *B. glabrata* infectada por *E. paraensei* foi demonstrada, indicando que a infecção por este equinostomatídeo diminui a capacidade do hospedeiro intermediário em realizar reações oxidativas aeróbias. Variações relevantes relacionadas ao estado mitocondrial desacoplado (estado 3u) de *B. glabrata* infectada por tal trematódeo foram também descritas. Tais resultados demonstram redução na taxa de descarboxilação oxidativa das reações que integram o ciclo do ácido tricarboxílico e aceleração do processo de degradação anaeróbia de carboidratos nos moluscos infectados, através da fermentação láctica, essencial para garantir a obtenção de energia e o sucesso da infecção. Assim, os resultados observados neste estudo demonstram que a infecção com cinco ou 50 miracídios de *E. paraensei* provocou consideráveis alterações metabólicas em *B. glabrata*, sendo que os moluscos expostos a maior carga miracídial apresentaram os maiores danos, caracterizando uma resposta dose-dependente.

**Palavras-chaves:** *Biomphalaria glabrata*, *Echinostoma paraensei*, homeostase.

## ABSTRACT

TUNHOLI, Victor Menezes Alves. **Metabolism characterization Aerobic and Anaerobic *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (Pulmonata, Planorbidae) Experimentally Infected With Different Doses of Miracidiais *Echinostoma paraensei* Lie and Basch, 1967 (Trematoda, Echinostomatidae).** 2016. 101p Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Animal). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

Parasites belonging to the *Echinostoma* genus are characterized by having a complex biological cycle, with two intermediate hosts and a final habitat restricted to the intestinal lumen of the definitive hosts. These hosts include aquatic birds, mammals (including humans) and occasionally some reptile and fish species. Their first intermediate hosts are freshwater snails, into which the miracidia actively penetrate for development of the next three stages (sporocysts, rediae and cercariae). Freshwater crustaceans, amphibians, fish and snails act as the second intermediate hosts, enabling the formation of metacercariae, the infective larval stage to the definitive host. In this work, *Biomphalaria glabrata* specimens were experimentally infected with different doses (5 or 50) of *E. paraensei* miracidia. The snails were dissected one, two, three and four weeks after infection to collect the hemolymph, shells and tissues (gonad-digestive gland complex- GDG). In the hemolymph were quantified glucose concentrations and carboxylic acids (succinic, pyruvic, lactic and oxalic acids), as well as the activity of lactate dehydrogenase (LDH). The storage of tissues was measured glycogen content and oxygen consumption (O<sub>2</sub>). Changes were observed in glycemia of the snails, in both situations parasitism, with significant increase in glucose levels observed from the third week post infection when compared to the control group. Changes have also been described in relation to the activity of lactate dehydrogenase and are characterized by the increase of its activity in the later periods of infection. In parallel, there was a decrease in glycogen content in storage tissues, being such greater reduction in the digestive gland (larval development site) in comparison to the cephalopedal mass. In addition, the infection by both miracidiais doses resulted in increased levels of oxalic acid and lactic acid, as well as a decline in the content of pyruvic and succinic acids in *B. glabrata*. The prepatent infection by this equinostomatideo still significantly suppressed the phosphorylation state (state 3 respiration) and basal oxygen consumption (state 1 and 2) in *B. glabrata*, demonstrating that infection by *E. paraensei* decreases the capacity of the intermediate host in performing aerobic oxidative reactions. These results demonstrate the reduction in oxidative decarboxylation rate of the reactions that are part of the tricarboxylic acid cycle and acceleration of the process of anaerobic degradation of carbohydrates in the infected snails by lactic acid fermentation, it is essential to ensure the obtaining of energy and the success of the infection. Thus, the results observed in this study demonstrate that infection with five or 50 miracidia of *E. paraensei* caused significant metabolic changes in *B. glabrata* snails being exposed to the largest load miracidial showed the greatest damage, featuring a dose-dependent response.

**Key words:** *Biomphalaria glabrata*, *Echinostoma paraensei*, homeostasis.

## INTRODUÇÃO

Moluscos pertencentes às classes Gastropoda e Bivalvia são organismos invertebrados de grande importância para a medicina humana e veterinária, pois participam como hospedeiros intermediários de ciclos de vários parasitos principalmente dos trematódeos digenéticos. Muitos desses helmintos acometem animais domésticos e de produção, bem como o homem causando respectivamente, perdas econômicas e problemas de saúde pública (SANTOS et al., 2009).

Os resultados dos inúmeros tipos de relações parasito-hospedeiro existentes são quase sempre interpretados como um processo adaptativo que ocorre entre ambos os organismos (TOFT et al., 1991; LAFFERTY, 1992; PINHEIRO et al., 2009). Como consequência, alterações comportamentais são demonstradas nos hospedeiros infectados, onde passam a optar por micro habitat e tipos de dietas que diferem dos organismos não parasitados. Além disto, mudanças fenotípicas, na habilidade competitiva e na atratividade aos companheiros são observados nos animais infectados (MOORE; GOTELLI, 1990) facilitando a transmissão do parasito (MOORE, 1983; ALBERTO-SILVA et al., 2015).

Para Trail (1980), as infecções por larvas de trematódeos e nematóides promovem não apenas alterações nos padrões fisiológicos de moluscos por afetar seu metabolismo, mas também são capazes de induzirem mudanças no comportamento do hospedeiro que resultam em economia de energia. Deste modo, o hospedeiro passa a gastar menos energia nos padrões de comportamento agressivo, de corte e de reprodução, poupando-a de forma que possa ser disponibilizada para garantir o completo desenvolvimento parasitário (MINCHELLA, 1985). Por outro lado, segundo Becker (1980), ao invadir o seu hospedeiro molusco, as larvas de trematódeos causam-lhe danos pela retirada de substâncias, induzindo neste, um balanço energético negativo. Além disto, tais larvas ainda eliminam os seus produtos de excreção/secreção que acabam alterando momentaneamente a composição normal da hemolinfa e alterando o sistema neuroendócrino e imunológico do molusco, interferindo na homeostase do hospedeiro.

Parasitos pertencentes ao gênero *Echinostoma* (Rudolphi, 1809) apresentam grande importância tanto em medicina humana quanto veterinária por infectarem quando adultos uma ampla variedade de hospedeiros vertebrados, incluindo desde espécies de peixes, répteis, aves e mamíferos. Adicionalmente, dados indicam a infecção de humanos por equinostomatídeos através da ingestão de caramujos e peixes crus ou mal cozidos (KANEV et al., 2000).

O molusco planorbídeo *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) está comumente associado à alta morbidade da esquistossomose devido à vasta distribuição e altos índices de infecção, advindo desse fato, sua grande importância em saúde pública. Concomitantemente, estudos observacionais e experimentais têm constatado a susceptibilidade de *B. glabrata* à infecção por *Echinostoma paraensei* (Lie & Basch, 1967) (MALDONADO et al., 2001a,b).

O trematódeo digenético *E. paraensei* foi descrito no Brasil a partir de *B. glabrata* naturalmente infectadas e coletadas no estado de Minas Gerais, tendo todas as fases do seu ciclo biológico desenvolvidas em laboratório. Em adição, a descrição morfológica de todos os seus estágios evolutivos foi realizada com auxílio da microscopia de luz e eletrônica (LIE; BASCH, 1967; MALDONADO et al., 2001; PINHEIRO, 2003).

Muitos estudos têm sido realizados com o objetivo de elucidar o ciclo de vida dos parasitos, sua rota de migração e como a infecção por larvas de helmintos se processa ao longo do tempo em que estão hospedando moluscos (WHITE et al., 2005; MOSTAFA, 2007; MELLO-SILVA et al., 2010). No entanto, pouco se conhece sobre as alterações fisiológicas impostas pela infecção de *E. paraensei* em *B. glabrata*.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 *Biomphalaria* Preston, 1910**

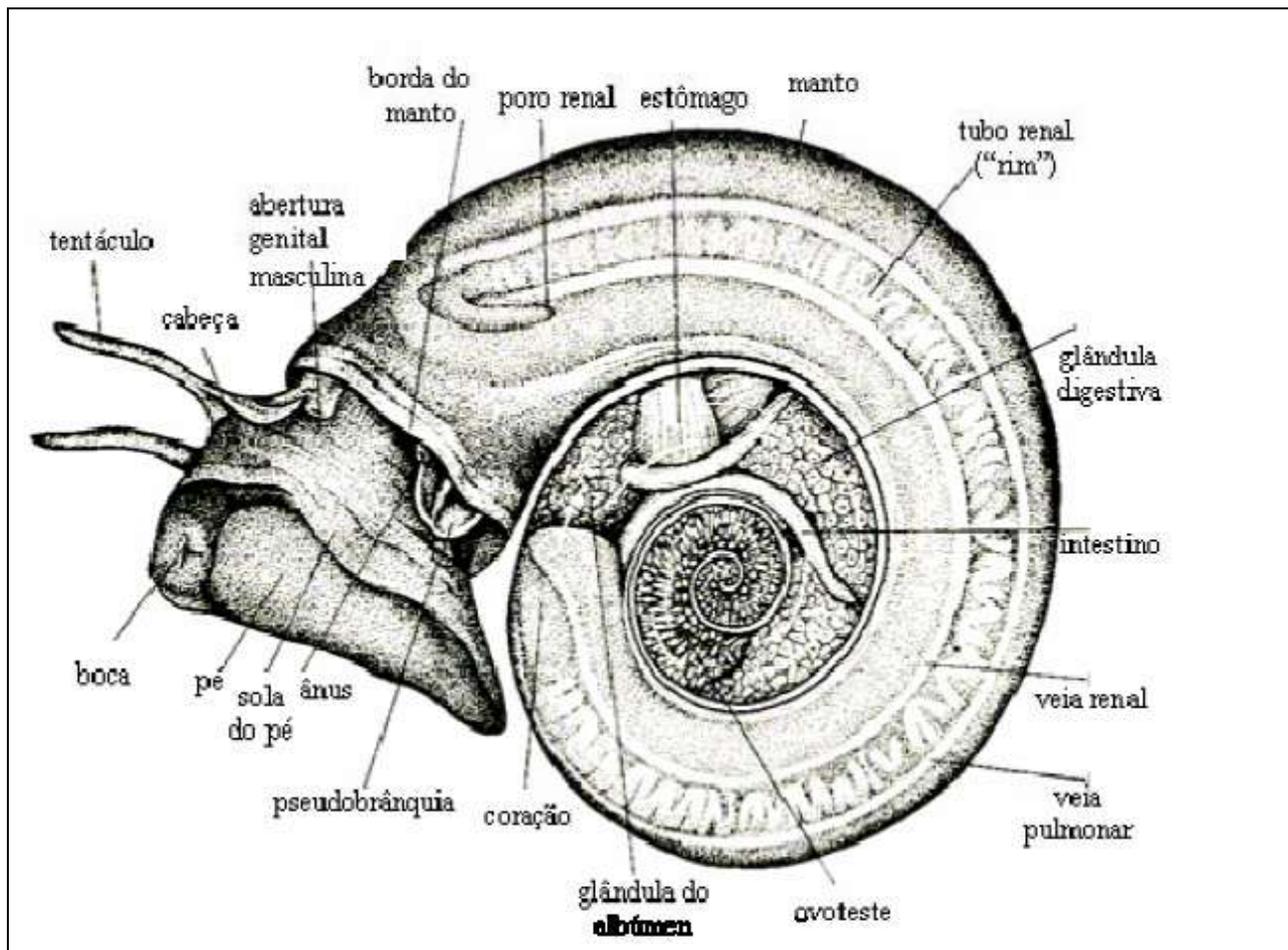
Em termos de abundância de espécies, moluscos constituem o segundo maior filo de invertebrados, logo após os artrópodes. Mais de 50.000 espécies vivas de moluscos já foram descritas (BARKER, 2001). Os gastrópodes compreendem cerca de três quartos do número total de espécies de moluscos já notificados. Os pulmonados, que incluem a ordem Basommatophora, estão representados nas águas continentais da América do Sul pelas seguintes famílias: Chiliniidae, Lymnaeidae, Physidae, Ancyliidae e Planorbidae (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). Muitos destes organismos têm importância fundamental no ciclo de vida dos trematódeos digenéticos e alguns nematóides, atuando como hospedeiros intermediários (ROLLINSON, 2001). Adema e Loker (1997) 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 imprescindíveis para o desenvolvimento ontogênico de tais parasitos. De acordo com Cribb et al. (2001) e Dillon (2000), aproximadamente 40.000 espécies de trematódeos requerem moluscos para completarem seu ciclo de vida, havendo relatos de cercárias emergindo de moluscos de 76 diferentes famílias pertencentes as classes Gastropoda (66

famílias), Bivalvia (9 famílias) e Scaphopoda (1 família). Estes dados refletem a importância dos gastrópodes e em especial a espécie *B. glabrata* como hospedeiros de parasitos que infectam animais silvestres e domésticos, incluindo humanos.

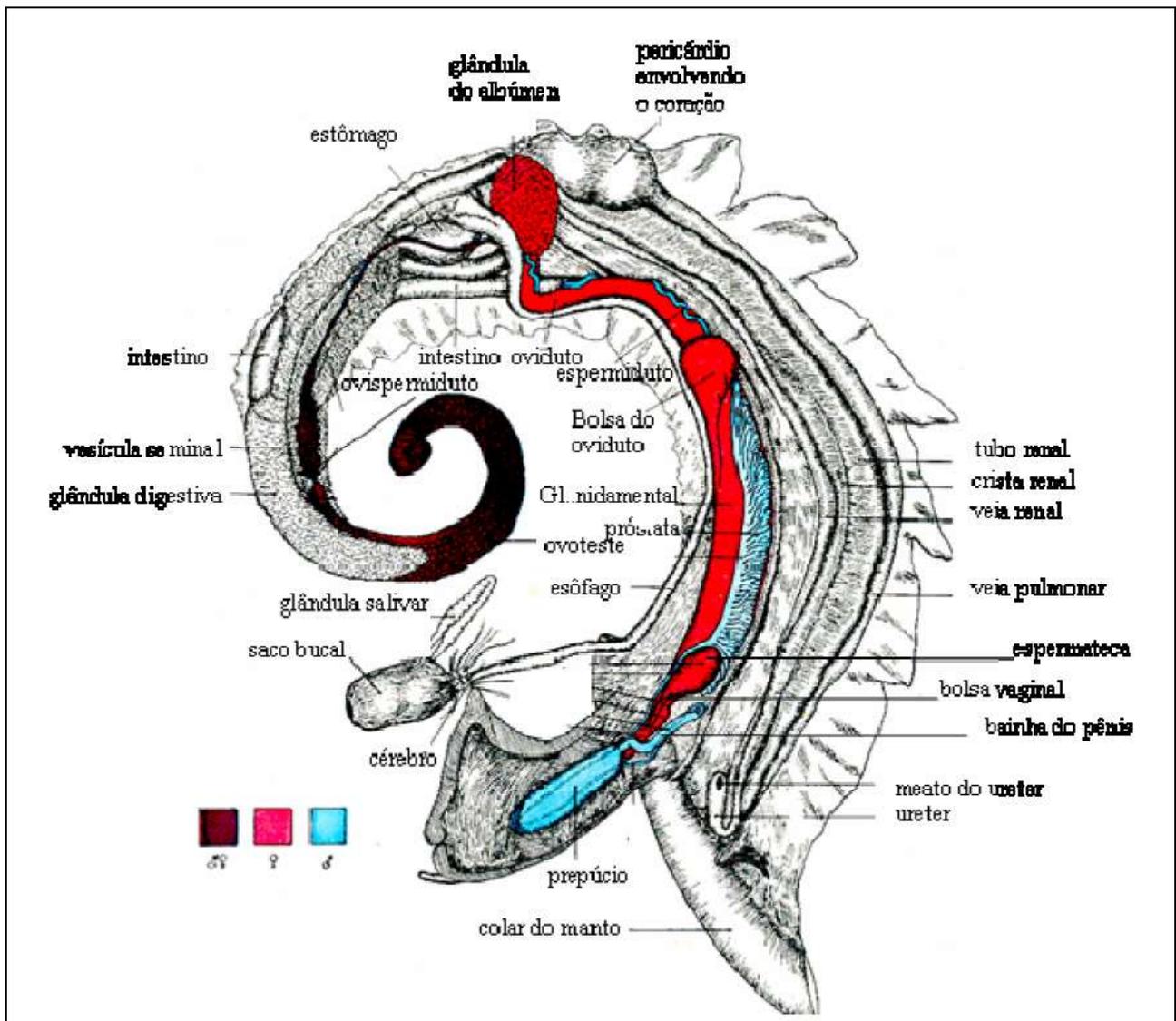
Estudos sobre a helmintofauna têm registrado inúmeras associações parasito-molusco em várias regiões brasileiras sendo *Biomphalaria* o gênero com maior variedade de tipos cercarianos (PARAENSE; ARAÚJO, 1984; SOUZA et al., 1998; THIENGO et al., 2004). Segundo Rohde (2001), a estreita relação observada entre moluscos e trematódeos digenéticos sugere que estes tiveram origem de um ancestral turbelário rabdocele de vida livre, que habitava como comensal a cavidade palial de moluscos, tornando-se posteriormente, parasitos obrigatórios e dependentes, tendo desenvolvido vários tipos de adaptações que assegurassem a infecção nestes hospedeiros.

Moluscos *Biomphalaria* Preston, 1910, pertencem ao Filo Mollusca, Classe Gastropoda, Subclasse Pulmonata, Ordem Basommatophora e Família Planorbidae. O nome do gênero tem origem do latim e refere-se a *Bis* (duas vezes) e *omphalos* (umbigo), devido ao aprofundamento do giro central em ambos os lados da concha. No Brasil, as sinônimas aceitas e empregadas para *Biomphalaria* são *Planorbina* Haldeman, 1843, *Armigerus* Clessin, 1884, *Thaphius* H.A. & Adams, 1855, *Tropicorbis* Brow & Pilsbry, 1914, *Australorbis* Pilsbry, 1934 (PARAENSE, 1975).

Anatomicamente, a massa cefalopediosa (cabeça e pé), exposta quando o molusco se movimenta é unida pelo colo à massa visceral que é permanentemente protegida pela concha (Figura 1). Na massa cefalopediosa (lado esquerdo) encontra-se a abertura anal e proximamente ao colo, verificam-se as aberturas genitais masculina e feminina separadas, uma vez que são hermafroditas. O sistema genital é composto basicamente por um ovoteste, que produz óvulos e espermatozóides, seguido de um canal para a passagem dos mesmos, o ovispermiduto, o qual se divide em dois ramos, um masculino (o espermiduto) e outro feminino (o oviduto) (Figura 2) (PARAENSE; DESLANDES, 1955).



**Figura 1** Esquema ilustrativo de *Biomphalaria glabrata* sem a concha, vista pelo lado esquerdo.  
 Fonte: Paraense; Deslandes, 1955.



**Figura 2** Vista lateral dos órgãos de *Biomphalaria glabrata* com o manto e o saco bucal dissecados (Figura ilustrativa). Legenda e apresentação das figuras modificada a partir dos originais. Fonte: Paraense; Deslandes (1955).

*Biomphalaria* abrange cerca de vinte espécies, sendo amplamente distribuída na África, América do Sul, Caribe, sudoeste da Ásia (Arábia Saudita e Iêmen), na América Central e sul dos Estados Unidos (PARAENSE, 1975), com características biológicas fundamentais para garantirem a sua preservação e a expansão de suas espécies e populações, mesmo em ambientes sujeitos as perturbações ambientais: 1) são hermafroditas e se reproduzem tanto por fecundação cruzada, quanto por autofecundação (PARAENSE, 1955); e, 2) em situações de seca, dessecam, mantendo-se vivos, recolhidos à concha, em estado fisiológico vegetativo, preservando-se até a próxima estação úmida (TUAN; SIMÕES, 1989).

No Brasil, este gênero possui onze diferentes espécies e uma subespécie (TEODORO et al., 2010) das quais três foram encontradas naturalmente infectadas por *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907): *B. glabrata*, *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835) e *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848), sendo a primeira considerada a de maior importância em saúde pública, devido à (1) ampla distribuição geográfica já notificada em 16 estados brasileiros mais o Distrito Federal (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007), (2) capacidade de adaptação em diferentes condições ambientais e (3) maior susceptibilidade à infecção pelo parasito e eliminação de cercárias por um longo período de tempo (SOUZA; LIMA, 1990).

Os equinostomatídeos, por sua vez, são exemplos adicionais de trematódeos digenéticos que apresentam como hospedeiros intermediários diferentes espécies de moluscos límnicos, incluindo *B. glabrata*, *Lymnaea columella* (Say, 1817) e *Physa marmorata* (Guilding, 1828). Muitas aves, mamíferos selvagens e domésticos, incluindo humanos mostram-se susceptíveis a infecção por *Echinostoma* spp, apresentando, portanto, importância médica e veterinária (MALDONADO Jr. et al, 2006). Em adição, trabalhos têm identificado a possibilidade de *B. glabrata* em atuar como hospedeiro intermediário de *Angiostrongylus costaricensis* Morera & Céspedes, 1971, *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) e *Angiostrongylus cantonensis* (Cheng, 1935) (BARÇANTE, 2003; TUNHOLI-ALVES et al., 2011).

Porém, atualmente pouco tem sido feito em relação à fisiologia comparada de moluscos de interesse médico-veterinário quando expostos a condições de estresse fisiológico, tais como o parasitismo, mesmo sendo este um dos pontos mais susceptíveis no ciclo de vida dos trematódeos e de certos nematóides ao controle, seja ele químico ou biológico.

## **2.2 *Echinostoma* spp**

### **2.2.1 Introdução**

*Echinostoma* tem como espécie tipo *Echinostoma revolutum* (Froelich, 1802) Dietz, 1909, entretanto, o grupo dos equinostomatídeos apresenta muitos aspectos controversos relacionados à sua taxonomia. Kanev (1994), utilizando apenas informações sobre a biologia de *E. revolutum*, afirmou que esta espécie utilizava exclusivamente aves como hospedeiros definitivos e moluscos límnicos como primeiro hospedeiro intermediário. Já os espécimes encontrados em roedores pertenceriam à espécie *Echinostoma caproni* Richard, 1964, que apresenta *Biomphalaria* spp. como primeiro e segundo hospedeiros intermediários e roedores como hospedeiro definitivo. O aspecto biológico levou a considerar *E. paraensei* e *E. caproni* como sinônimas (CHRISTENSEN et al., 1990); já Sloss et al. (1995), utilizando

ferramentas bioquímicas como eletroforese em gel, observaram que *E. paraensei* e *E. caproni* possuíam seis sistemas enzimáticos diferentes entre si, em um total de dez, demonstrando que *E. paraensei* está geneticamente mais próximo de *Echinostoma trivolvis* (Cort, 1914) do que de *E. caproni*, tratando-se, portanto, de espécies diferentes. Estudos baseados em técnicas de biologia molecular (FUJINO et al., 1999), vêm ratificar os resultados obtidos por Sloss et al. (1995).

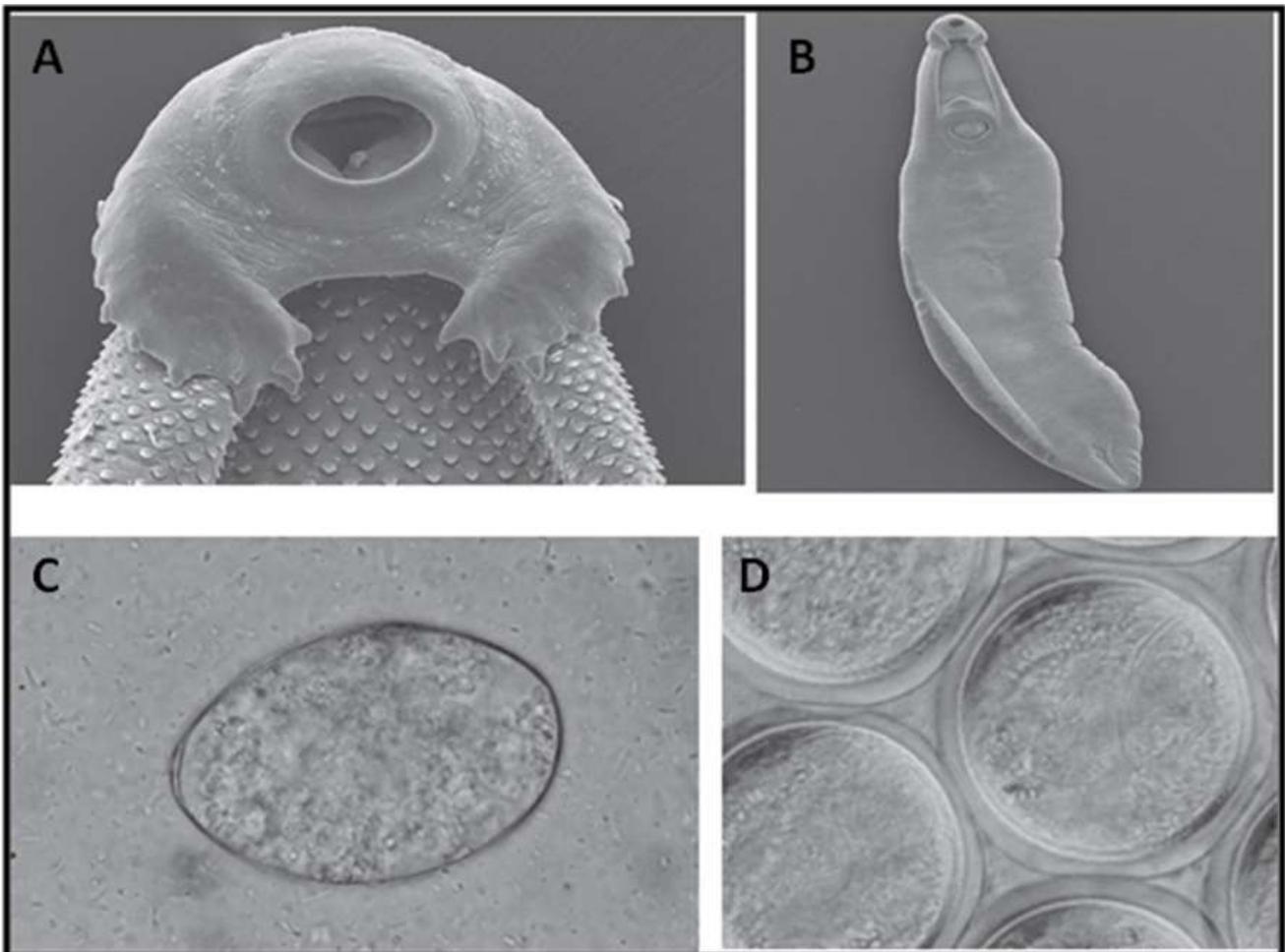
Estes parasitos têm sido largamente estudados por algumas razões: (1) apresentam ampla distribuição geográfica; (2) são encontrados infectando muitas aves, mamíferos selvagens e domésticos, incluindo humanos. Muitos equinóstomas são hematófagos; (3) infectam a maioria dos órgãos e sítios na cavidade abdominal das aves e mamíferos, incluindo o trato alimentar, excretor e sistemas reprodutores; (4) adultos e larvas constituem bons materiais para estudos biológicos, fisiológicos, bioquímicos, imunológicos e outros estudos em biologia moderna; e (5) podem ser mantidos facilmente em laboratório com baixo custo (KANEV, 2000).

### **2.2.2 Morfologia e classificação**

A morfologia de vários estágios de equinóstomas está demonstrada na Figura 3. Helmintos adultos pertencentes à família Echinostomatidae são morfologicamente caracterizados pela presença de um colar cefálico guarnecido por espinhos ao redor da ventosa oral (Figura 3(A)). O número e a disposição dos espinhos presentes no colar cefálico são considerados importantes aspectos empregados na classificação taxonômica destes parasitos. Significativas variações no tamanho de equinóstomas adultos têm sido registradas, podendo estas ser em parte justificadas em função da espécie de *Echinostoma* relacionada, em decorrência do procedimento de fixação utilizado, bem como, da espécie de hospedeiro definitivo envolvida. Neste contexto, os equinóstomas adultos são classificados como pequenos, se apresentarem comprimento longitudinal de até 5 mm; médios, quando apresentarem comprimento entre 5-10 mm e, grandes, quando portarem comprimento maior que 10 mm. Os espinhos presentes no colar cefálico podem estar organizados em uma ou duas fileiras circulares sendo o número de espinhos constante para cada espécie de equinostomatídeo. O tegumento é revestido por escamas semelhantes a espinhos em ambas as superfícies ventral e dorsal, embora o número e tamanho dos espinhos sejam reduzidos na metade posterior do corpo do parasito (Figura 3(B)). As ventosa oral e ventral estão situadas

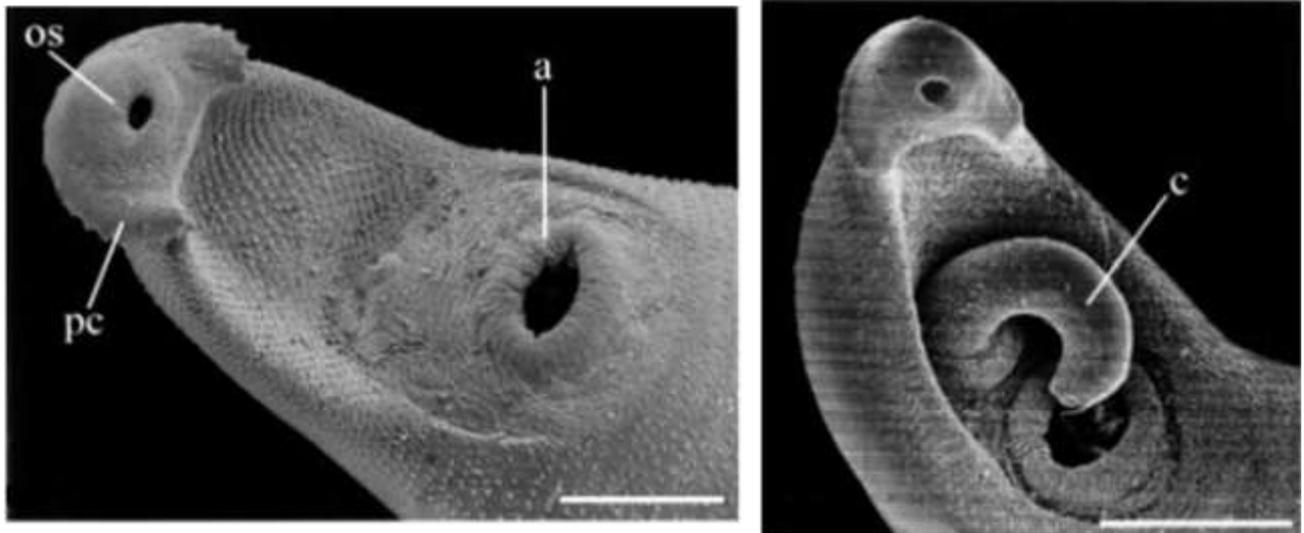
próximas uma da outra. Os dois testículos, geralmente em conjunto, são posteriores ao ovário (TOLEDO; FRIED, 2014).

Existe considerável controvérsia em relação à sistemática dos membros da família Echinostomatidae, particularmente relacionado à *Echinostoma*. Isto pode ser atribuído a vários fatores, incluindo espécies identificadas incorretamente ou espécimes que foram insuficientemente descritos, a existência de substancial homogeneidade interespecífica associada às características morfológicas observadas nas fases adultas, bem como a grande diversidade de hospedeiros vertebrados definitivos e a ampla distribuição geográfica. Segundo alguns autores, os equinostomatídeos têm sido considerados como um táxon monofilético, embora a morfologia e a diversidade dos critérios adotados por diferentes pesquisadores levaram a sua divisão em um número impressionante de táxons (ou seja, um total de 21 subfamílias) (Fonte: TOLEDO; FRIED, 2014).

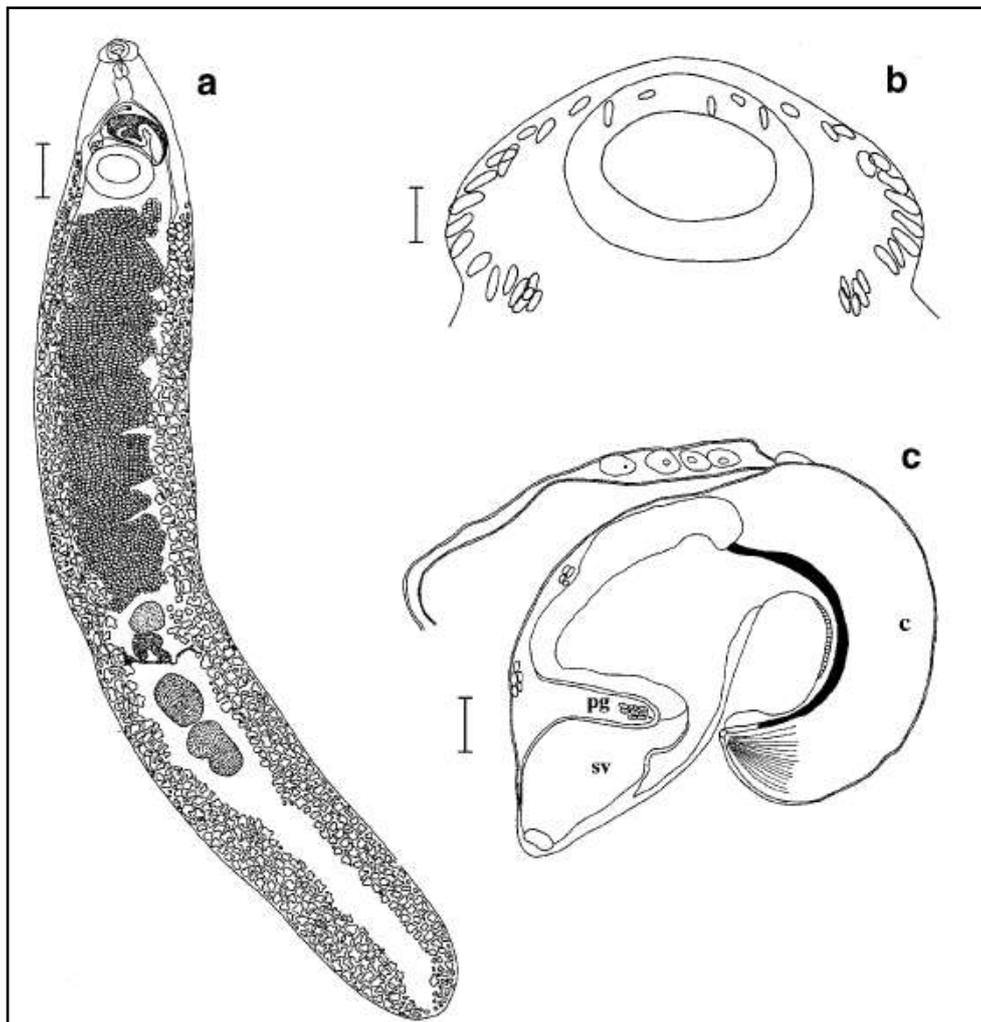


**Figura 3** Microscopia de *Echinostoma*: (A) micrografia eletrônica de varredura destacando o colar cefálico de espinhos de um exemplar adulto de *E. caproni* (barra de escala: 200  $\mu$ m); (B) micrografia eletrônica de varredura de um helminto adulto de *E. caproni* demonstrando o colar de espinhos (barra de escala: 1 mm); (C) ovo de *Echinostoma* sp. recuperado de amostras fecais humanas (barra de escala: 50  $\mu$ m); e (D) metacercárias de *Echinostoma* sp. coletadas a partir de espécimes de *Biomphalaria glabrata* experimentalmente infectadas (barra de escala: 75  $\mu$ m). Fonte: Toledo; Fried (2014).

*Echinostoma paraensei* é um representante de equinostomatídeo no Brasil, pertencente ao grupo “*revolutum*”, pois quando adultos os helmintos apresentam colar cefálico ou peristômico formado por 37 espinhos (Figura 4 e 5).



**Figura 4** Micrografia eletrônica de *Echinostoma paraensei* (isolado do Rio de Janeiro). A Vista ventral de *E. paraensei* demonstrando a ventosa oral (os), colar peristômico (pc), acetábulo (a). B Vista ventral demonstrando colar peristômico e bolsa do cirro protuberada (c). Fonte: Maldonado et al. (2001).



**Figura 5** *Echinostoma paraensei* (isolado do Rio de Janeiro). a parasito adulto, 28 dias de idade, b collar peristômico, c bolsa do cirro (c), vesícula seminal (sv), glândula prostática (pg) e útero terminal com ovos (Barras de escalas são 100 $\mu$ m exceto para o parasito adulto que é 1mm). Fonte: Maldonado et al. (2001).

Maldonado et al., (2001a,b) identificaram como hospedeiro definitivo natural, o roedor *Nectomys squamipes* Brants, 1827, conhecido popularmente como rato d'água, e propuseram o ciclo de vida natural deste parasito (Figura 4). Estes pesquisadores também demonstraram que larvas de *E. paraensei* em *B. glabrata* podem interferir potencialmente na sobrevivência de *S. mansoni*. Alguns estudos realizados por estes autores demonstraram a participação direta de *E. paraensei* no controle biológico da esquistossomose, pois as rédias deste parasito atacam e destroem os esporocistos de *S. mansoni*. Deste modo, verificar as possíveis

alterações fisiológicas nos moluscos parasitados por *E. paraensei* contribuirá para elucidar este processo.

Segundo Brooks e McLennam (1993), taxonomicamente *E. paraensei* está classificada da seguinte forma:

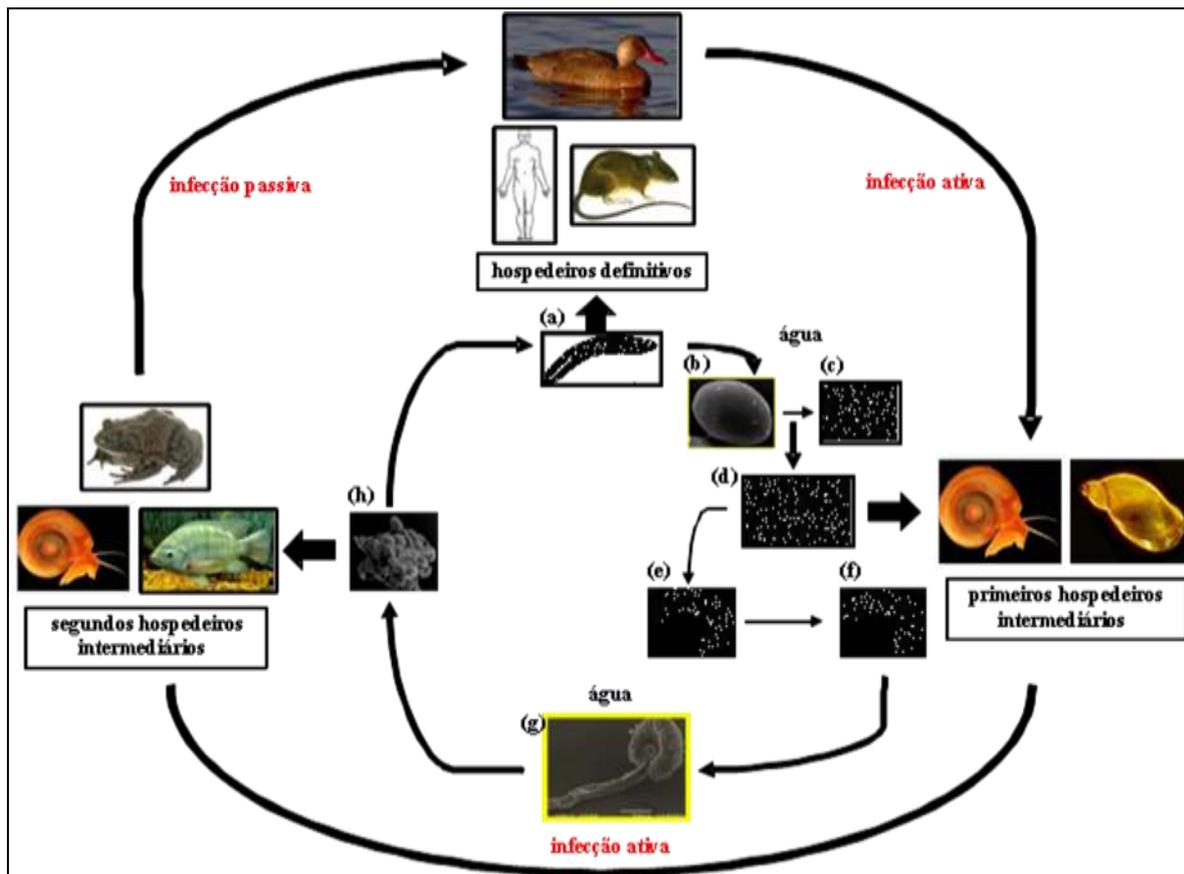
- Filo: Platyhelminthes
- Superclasse: Cercomeria Brooks, 1982
- Classe: Cercomeridae Brooks, O'Grady & Glen, 1985
- Subclasse: Trematoda Rudolphi, 1808
- Infraclasse: Digenea Carus, 1863
- Ordem: Echinostomatida La Rue, 1957
- Superfamília: Echinostomatoidea Looss, 1899
- Família: Echinostomatidae Looss, 1899
- Gênero: *Echinostoma* Rudolphi, 1809
- Espécie: *Echinostoma paraensei* (Lie & Basch, 1967)

### 2.2.3 Ciclo de vida

Quando adultos parasitos pertencentes ao gênero *Echinostoma* mostram-se essencialmente hermafroditas apresentando como sítio de infecção final o intestino delgado e o ducto biliar de numerosos hospedeiros vertebrados, particularmente aves aquáticas ou semi-aquáticas e mamíferos, incluindo humanos. Em meio silvestre, o ciclo de vida de um equinostomatídeo é mantido a partir de um hospedeiro definitivo infectado que elimina, juntamente com suas fezes, ovos do parasito (Figura 1 (C)). Ao alcançarem coleções hídricas (rios, lagos e lagoas) tem-se início o processo de embriogênese dos ovos culminando com a completa formação dos miracídios. Este processo dura em média de 2-3 semanas a uma temperatura média de 22<sup>0</sup>C. Uma vez formados, observa-se a eclosão dos miracídios que ativamente localizam o seu primeiro hospedeiro intermediário por meio da identificação de glicoconjugados por ele secretado. Várias espécies de planorbídeos, limnéídios e bulinídeos, tais como, *B. glabrata*, *Lymnaea columella* (Say, 1817) e *Physa marmorata* (Guilding, 1828) têm sido registradas como primeiros hospedeiros intermediários de *Echinostoma* spp. Os miracídios penetram ativamente na massa cefalopédiosa do molusco hospedeiro infectando-o, transformando-se logo em esporocistos na cavidade cardíaca do mesmo. Duas gerações de rédias (mãe e filha) são observadas no interior do primeiro hospedeiro intermediário. Por fim, cercárias desenvolvem a partir de rédias filhas emergindo de moluscos infectados por volta de

4-6 semanas pós-infecção. Em um ambiente aquático e dulcícola, cercárias ativamente alcançam o segundo hospedeiro intermediário. As cercárias dos equinostomatídeos apresentam baixo grau de especificidade, e várias espécies de moluscos, rãs, crustáceos e peixes podem atuar como segundos hospedeiros intermediários. Tais estágios infectam ativamente seus hospedeiros através da abertura cloacal nos crustáceos ou por meio do poro excretor em moluscos, encistando principalmente nos rins e cavidades pericárdicas destes; as cercárias podem ainda penetrar ativamente a musculatura de peixes encistando neste sítio (TOLEDO; FRIED, 2014).

O hospedeiro definitivo torna infectado após a ingestão do segundo hospedeiro intermediário contendo a metacercária (Figura 1(D)). Após infecção, *Echinostoma* não realiza migração sistêmica no hospedeiro definitivo. As metacercárias desencistam na luz duodenal e os parasitos imaturos migram para o jejuno onde fixam na mucosa intestinal auxiliados pela presença de ventosas orais e acetabulares. Numerosos vertebrados incluindo aves aquáticas e semi-aquáticas, roedores e humanos, podem atuar como hospedeiros definitivos de equinóstomas. A eliminação de ovos por tais hospedeiros frequentemente ocorre entre 10-16 dias pós-infecção. Embora a eliminação de ovos seja contínua desde o primeiro dia de patência, variações significativas ao longo do curso de infecção tem sido documentada. A duração da infecção pode variar de uma a duas semanas, no entanto, dependendo da espécie de equinóstoma envolvida, bem como da capacidade imunológica do hospedeiro, a infecção poderá persistir por até um ano (TOLEDO; FRIED, 2014) (Figura 6).



**Figura 6** Ciclo de vida geral de *Echinostoma* spp.: (a) helmintos adultos habitam o intestino delgado de vários hospedeiros vertebrados, incluindo humanos; (b) ovos são eliminados juntamente com as fezes do hospedeiro definitivo; (c) eclosão dos miracídeos em coleções hídricas e infecção ativa em moluscos; (d) esporocistos, (e) rédias mãe e, (f) rédias filhas, são os estágios de desenvolvimento parasitário que ocorrem no interior do primeiro hospedeiro intermediário; (g) cercárias são eliminadas e nadam até localizarem e infectarem o segundo hospedeiro intermediário (gastrópodes límnicos, anfíbios, peixes) na qual encistam transformando em metacercárias; (h) as metacercárias são ingeridas pelo hospedeiro definitivo e desencistam evoluindo para helmintos adultos.

### 2.2.4 Epidemiologia

Equinóstomas são comumente encontrados parasitando aves (aquáticas ou semi-aquáticas) e mamíferos associados com habitats dulcícolas. Em geral, sua especificidade para com o hospedeiro definitivo é baixa e uma única espécie de *Echinostoma* é capaz de infectar várias espécies de hospedeiros vertebrados. A distribuição geográfica de tais helmintos é dependente da presença de moluscos que atuam como primeiros hospedeiros intermediários,

uma vez que, os equinóstomas apresentam especificidade restrita para com estes organismos (TOLEDO; FRIED, 2014).

Nos dias atuais, torna-se muito difícil determinar com precisão a taxa de incidência da equinostomíase humana em função da indisponibilidade de dados e de inquéritos epidemiológicos, sendo a maioria das informações baseadas em relatos de casos ocasionais. A abrangência da equinostomíase humana é determinada por hábitos alimentares. Humanos tornam-se infectados quando ingerem peixes, cobras, anfíbios e moluscos crus ou mal cozidos contendo formas de metacercárias. As infecções são, portanto, mais prevalentes em áreas onde certas práticas culturais persistem, como por exemplo, o hábito de humanos em ingerir peixes, anfíbios, cobras, bivalves ou moluscos crus ou mal-cozidos (CHAI; LEE, 2002). Nas Filipinas, as infecções em humanos decorrem da ingestão de peixes crus mergulhados em uma mistura de sal e vinagre, conhecido localmente como *kinilaw*. Todos os pacientes infectados por equinóstomas apresentam histórico de terem consumidos moluscos preparados com leite de coco e suco de limão, especialmente quando encontrados em maior abundância durante estação chuvosa. Isto sugere que vários tipos de marinados e preparações alimentícias não afetam a viabilidade das metacercárias. Além disso, autores têm verificado que a ingestão de água não tratada contendo tipos cercarianos de equinostomatídeos pode ser considerada uma fonte de infecção em humanos (CHAI, 2008).

A equinostomíase humana limita-se em áreas onde ambos os hospedeiros intermediários (primeiro e segundo) compartilham do mesmo habitat, bem como em ambientes que apresentam condições climáticas que favorecem a dinâmica de transmissão do parasito. Neste contexto, a distribuição de tal enfermidade torna-se amplamente localizada (CHAI, 2008). A maioria das infecções humanas é reportada em países situados no Leste e Sudeste Asiáticos tais como China, Índia, Indonésia, Coréia, Malásia, Filipinas, Rússia, Taiwan, e Tailândia. Adicionalmente, casos autóctones têm sido registrados em outros países. O crescimento populacional, poluição, pobreza, e falta de saneamento básico têm contribuído para o aumento das taxas de infecção em diversas áreas. Em contraste, os avanços sociais e econômicos, combinados com campanhas de educação em saúde e a administração de medicamentos em massa a base de praziquantel e albendazol, têm favorecido para a redução da prevalência em outros ambientes (TOLEDO; FRIED, 2014).

## **2.2.5 Importância dos equinostomatídeos em saúde pública**

Parasitas da família Echinostomatidae (=equinóstomas) constituem cerca de 50 gêneros, com 355 espécies descritas, e seis subespécies. Dentre eles, até 1964, um total de 13 espécies apresentava a capacidade de realizar infecções em humanos (YAMASHITA, 1964). Todavia, trabalhos mais recentes destacam que o número de equinóstomas infectando humanos tem aumentado para um total de 20-21 espécies (CHAI, 2007).

Por muitos anos sabe-se que equinóstomas parasitam humanos. Infecções humanas por tais parasitos foram demonstradas no Brasil durante o período pré-Colombiano. Estudos paleoparasitológicos têm constatado a presença de ovos de *Echinostoma* em coprólitos de corpos humanos mumificados no Brasil, que apresentam grande similaridade com *E. paraensei* e *E. luisrey* (SIANTO et al., 2005; LELES et al., 2014). Entretanto, o primeiro relato de equinostomíase humana foi registrado por Garrison (1908) que encontrou ovos de um equinostomatídeo nas fezes de cinco prisioneiros em Manila (Filipinas), junto com a recuperação de 21 helmintos adultos a partir de um paciente após o tratamento com praziquantel. Tais parasitos foram identificados como sendo pertencentes à *Echinostoma ilocanum*. Depois disto, vários registros foram realizados na Ásia. Por exemplo, Majima (1927) observou infecções por *E. macrorchis* em humanos e Hirazawa (1928) demonstrou infecção humana por *Echinostomus perfoliatus* no Japão. Anazawa (1929) ainda verificou, em Taiwan, cinco casos de equinostomíase humana por *E. revolutum*.

Particular interesse é conferido aos estudos publicados por Sandground e Bonne (1940) que constituem a primeira abordagem epidemiológica da equinostomíase humana. Casos de equinostomíases em humanos, descobertos durante autópsias, foram relatados por Sandground e Prawirohardjo (1939). A maioria dos helmintos recuperados foi classificada como *E. ilocanum*, porém alguns espécimes de *E. recurvatum* e *E. revolutum* foram também identificados. Sandground (1939) ainda reportou que equinóstomas foram frequentemente recuperados de roedores silvestres próximos a Jacarta, Indonésia. No mesmo estudo foi documentada a descoberta de um foco endêmico de *E. ilocanum* em moradores de uma colônia rural situada na mesma região. Bonne e Sandground (1939) e Sandground e Bonne (1940) demonstraram vários focos endêmicos de transmissão de *E. echinatum* (= *E. lindoense*) na Sulawesi Central, Indonésia. *Echinostoma malayanum* tem também sido encontrado infectando humanos em Sumatra, Indonésia (BONNE, 1941). Atualmente, estima-se que cerca de vinte espécies de equinostomatídeos estejam relacionadas com a equinostomíase humana, sendo endêmica no Sudeste Asiático e extremo Oriente. A grande maioria destes focos endêmicos está localizada na China, Índia, Indonésia, Coréia, Malásia,

Filipinas, Rússia, Taiwan, e Tailândia. Em adição, casos autóctones da doença tem também sido reportados em outros países (GRACZYK; FRIED, 1998; CHAI, 2008; TOLEDO et al., 2012).

### **2.2.6 Importância de *Echinostoma* spp. em animais silvestres e domésticos.**

A infecção por *Echinostoma* spp. tem sido registrada em muitos animais silvestres. Por exemplo, Maldonado et al. (2006) identificaram a presença de *E. paraensei* em *Nectomys squamipes* Brants, 1827 após necropsia. Presença de *E. trivolvis* tem sido verificada no intestino delgado de gaviões e corujas durante estudos observacionais realizados por Taft et al. (1993). Adicionalmente, Huffman (2000) relatou que os equinostomatídeos representam um significativo impacto na saúde de mamíferos aquáticos. Segundo alguns autores, a transmissão destes parasitos no ambiente silvestre e não silvestre pode ser facilitada por apresentarem baixa especificidade para com o hospedeiro vertebrado definitivo, bem como em função das alterações ambientais ecológicas e climáticas induzidas pelo homem, em especial o desmatamento, que acabam exercendo intensa pressão sobre os animais silvestres, forçando suas migrações para novos habitats (KING et al., 2007).

*Echinostoma* spp. pode ser visto parasitando animais domésticos e peridomésticos como cães residentes em áreas metropolitanas, suínos, galinhas e patos (LUTZ, 1924). Tal cenário epidemiológico é resultado do aumento da interface entre animais silvestres e domésticos associado a fatores antropogênicos (agentes de transformação da dinâmica global).

Além dos registros naturais, vários estudos experimentais têm analisado o estabelecimento de *Echinostoma* spp. em algumas aves, como as galinhas domésticas (HUMPHRIES et al., 1997). Fried (1984) registrou 100% de infectividade de *E. trivolvis*, com uma recuperação de 25% dos helmintos adultos em aves domésticas experimentalmente infectadas. A mesma metodologia foi utilizada para verificar as taxas de infectividade de *E. revolutum* e de recuperação dos parasitos adultos em galinhas. Como resultado, os autores estabeleceram infectividade entorno de 64 a 67%, com aproximadamente 32% de recuperação dos helmintos, caracterizando valores inferiores àqueles observados para *E. trivolvis* (MULLICAN et al., 2001).

Revisões propostas por Huffman e Fried (1990) e Fried e Huffman (1996) ainda registram acentuadas alterações anatomopatológicas no íleo, reto, cloaca, ceco e bolsa de Fabricius de aves domésticas naturalmente e experimentalmente infectadas por *E. trivolvis*, coincidindo com as regiões onde os helmintos foram recuperados.

## **2.3 Relação entre moluscos e larvas de helmintos**

### **2.3.1 Aspectos sobre o metabolismo glicídico em moluscos infectados por larvas de helmintos**

Muitos estudos têm constatado alterações no metabolismo de moluscos infectados por larvas de trematódeos, em particular nas concentrações de carboidratos. A interação entre larvas de helmintos e seus hospedeiros intermediários causa um estado de hipometabolismo nestes, que acabam utilizando de reservas para manterem suas funções vitais, bem como atender às necessidades energéticas das larvas durante etapa de desenvolvimento. Deste modo, estas alterações levam a um balanço energético negativo, caracterizado pelo consumo de glicogênio da glândula digestiva e massa cefalopédica, além de depósitos de galactogênio na glândula de albúmen (PINHEIRO; AMATO, 1994). Nestas circunstâncias, moluscos infectados começam a utilizar fontes não glicídicas para sua sobrevivência e reprodução, culminando em muitas alterações fisiológicas (PINHEIRO et al., 2009) e um processo de compensação na fecundidade como observado no modelo *E. paraensei* /*B. glabrata* (TUNHOLI et al., 2011a).

Mello-Silva et al. (2010), durante estudo experimental, avaliaram as influências da infecção por larvas de *S. mansoni* e da exposição ao látex de *Euphorbia milii* var. *splendens* no metabolismo de carboidratos de *B. glabrata*. Como principais resultados, os autores registraram severa redução nas concentrações de glicogênio, especialmente na glândula digestiva dos moluscos hospedeiros, com os menores valores apresentados pelos animais simultaneamente infectados e expostos ao látex. Estes resultados podem ser em parte justificados pela ativação de centros enzimáticos relacionados à glicogenólise, remetendo a ocorrência de mecanismos fisiológicos associados na manutenção do estado bioenergético do hospedeiro. O mesmo foi demonstrado por Thompson e Lee (1985) em *B. glabrata* submetidas a períodos de jejum, bem como infectadas por *S. mansoni*, indicando a presença de mecanismos homeostáticos objetivados na manutenção da glicemia, seja a partir da mobilização de reservas (glicogênio) ou através da modulação de vias bioquímicas (BECKER, 1980; CREWS; YOSHINO, 1990).

Variações expressivas no conteúdo de glicogênio da glândula digestiva de *B. alexandrina* (Ehrenberg, 1831) e *Bulinus truncatus* (Audouin, 1827) infectados com *S. mansoni* foram verificadas (ISHAK et al., 1975). Segundo os autores, as larvas do trematódeo em desenvolvimento poderiam indiretamente inibir centros enzimáticos ligados a

gliconeogênese, através de seus produtos de secreção/excreção, comprometendo a formação de reservas neste sítio. As mesmas alterações foram mais tarde verificadas por Iavorskii (1989) estudando a relação *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758)/*Lymnaea truncatula*.

Autores têm observado ativação de vias anaeróbias fermentativas como fator essencial para o sucesso da infecção de trematódeos (TUNHOLI et al., 2013) e nematóides (STEWART et al., 1985) em moluscos hospedeiros. Em estudo recente, Tunholi-Alves et al. (2014) verificaram aumento na atividade hemolinfática da lactato desidrogenase de *B. glabrata* quando infectada por *Angiostrongylus cantonensis* Chen, 1935. Esta variação foi mais pronunciada na segunda semana pós-infecção, representando um acréscimo de 210% em relação ao grupo controle. A ativação do metabolismo anaeróbio via lactato desidrogenase em moluscos infectados é fundamental para a sobrevivência do hospedeiro, uma vez que, possibilita o mesmo obter energia e excretar substâncias originadas de seu metabolismo sem comprometer suas estruturas celulares (SCHOTTLER, 1986). Para Nabih et al. (1993) a aceleração do metabolismo anaeróbio verificado em *B. alexandrina* experimentalmente infectada por *S. mansoni* pode ainda ser explicada em resposta a inibição da LD<sub>11</sub>, isoenzima associada a respiração aeróbia, concomitantemente a estimulação da LD<sub>5</sub>, isoenzima responsável pela manutenção da respiração anaeróbia do hospedeiro, a partir de produtos de secreção/excreção oriundos das larvas intra-molusco do trematódeo em desenvolvimento. Estes resultados demonstram que a interação parasito-hospedeiro promove severas alterações nos padrões fisiológicos do molusco por afetar seu metabolismo, sendo estas alterações interpretadas como um processo adaptativo que ocorre entre ambos os organismos (TUNHOLI-ALVES et al., 2014). Apesar destes estudos, não existem informações disponíveis sobre alterações no metabolismo de carboidratos em *B. glabrata* quando infectadas por diferentes doses miracidiais de *E. paraensei*.

### **2.3.2 Alteração nas concentrações de ácidos orgânicos em moluscos submetidos a condições de estresse fisiológico**

Massa et al. (2007) utilizando de análises de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) observaram que a infecção por larvas de *S. mansoni* resultou em uma significativa redução na concentração dos ácidos acético, fumárico, málico e pirúvico presentes em células do complexo gônada-glândula digestiva de *B. glabrata*. Segundo os autores, a redução observada nos níveis dos ácidos orgânicos analisados, pode ser em parte explicada pela utilização destas moléculas como substratos necessários para o desenvolvimento de

esporocistos e cercárias do parasito, que seriam incorporadas pelo mesmo a partir dos tecidos dos moluscos.

Em estudo recente, Tunholi-Alves et al. (2014) observaram que a infecção experimental de *A. cantonensis* resultou em alterações nas concentrações hemolinfáticas de alguns ácidos orgânicos em *B. glabrata*. Aumento nos níveis de ácido láctico foi constatado com a redução nos conteúdos de ácido pirúvico ao longo de três semanas de infecção em relação aos moluscos não-infectados. Estes resultados denunciam a ativação do metabolismo anaeróbio fermentativo considerado imprescindível à sobrevivência do hospedeiro por possibilitá-lo obter energia (ATP) a partir da redução do piruvato para lactato, assegurando a reoxidação do NADH. H<sup>+</sup>. Além disso, permitem os moluscos excretarem substâncias oriundas de seus metabolismos sem causar danos as suas estruturas celulares sendo, portanto, fator essencial que garante o sucesso da infecção por larvas de helmintos parasitos (SCHOTTLER, 1986).

Além de atuarem como excelentes bioindicadores do estado energético de moluscos hospedeiros, ácidos carboxílicos tem também sido utilizados como potentes ferramentas no diagnóstico de moluscos infectados por larvas de helminto, auxiliando estudos epidemiológicos desenvolvidos em áreas consideradas endêmicas (SALWA et al., 2010). As taxas de infecção em populações de moluscos são rotineiramente determinadas através da emissão cercarial, negligenciando a ocorrência de infecções pré-patentes. Assim, a quantificação de ácidos carboxílicos da hemolinfa e do complexo gônada-glândula digestiva (DGG) de *B. alexandrina* auxiliaria na discriminação entre moluscos infectados e não-infectados por *S. mansoni*. Utilizando da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) os pesquisadores observaram que a concentração de todos ácidos estudados (oxálico, málico, pirúvico, acético e fumárico) diminuiu significativamente em moluscos infectados quando comparado aos não-infectados em ambos os tecidos. A redução verificada pode ser explicada em decorrência da utilização destes metabólitos pelos esporocistos e cercárias do parasito em desenvolvimento. Estas larvas habitam os espaços intertubulares do DGG causando danos mecânicos nas células glandulares do tecido (THOMPSON, 1997). O dano celular resulta em um extravazamento dos ácidos, que são por sua vez incorporados pelas larvas do parasito. Além disso, o aumento da atividade metabólica do organismo hospedeiro associado com a presença de larvas de trematódeos pode acelerar o uso dos ácidos carboxílicos pelas células hospedeiras, abastecendo assim, reações químicas que integram o metabolismo intermediário do molusco (THOMPSON, 1997).

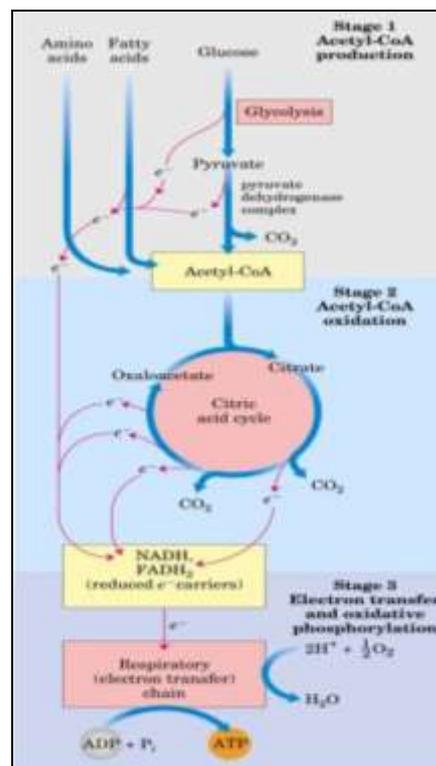
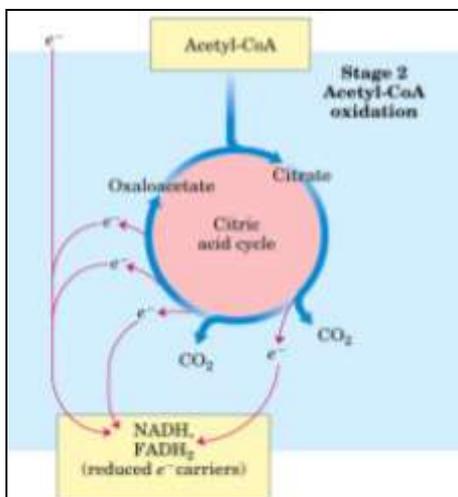
Em estudo experimental, Mantawy et al. (2013) demonstraram aumento significativo na concentração de ácidos málico e fumárico e decréscimo nos níveis de ácido succínico na hemolinfa de cepas de *B. alexandrina* susceptíveis e infectadas por *S. mamsoni* em relação a cepas resistentes. Segundo os autores, as alterações observadas podem ser explicadas em decorrência ao aumento da taxa metabólica vistas em moluscos infectados, que passam a utilizar de certos intermediários do ciclo de Krebs para a síntese de uma nova glicose, aminoácidos e lipídios na tentativa de manutenção de sua homeostase.

Uma diminuição nos níveis de ácidos succínico e fumárico foi também registrada por Kozlosk (2002) na hemolinfa de moluscos estivados quando comparado a organismos não-estivados. Para o autor, tal alteração metabólica é justificada em decorrência da redução do ácido fumárico pela fumarato redutase, enzima homóloga a succinato desidrogenase, que opera em sentido contrário ao ciclo de Krebs. Neste contexto, o ácido succínico é metabolizado a ácido propiônico culminando com a produção de energia livre (ATP) e reoxidação do  $\text{NADH}^+$  (Figura 7) imprescindível a manutenção de suas reações vitais.



conseguem sobreviver por longos períodos (meses ou anos) até que as condições ambientais tornem-se novamente favoráveis.

Em condições fisiológicas (“basais”) moluscos apresentam metabolismo aeróbio relacionado com a obtenção de energia e manutenção do balanço redox com recrutamento mínimo de vias anaeróbias fermentativas (STOREY, 1993). As reações que integram o ciclo do ácido cítrico e aquelas relacionadas à cadeia respiratória (Figura 8) exemplificam o metabolismo oxidativo em *B. glabrata* (TUNHOLI et al., 2013). Entretanto, durante infecção por larvas de trematódeos e nematóides um redirecionamento no fluxo metabólico do hospedeiro intermediário é observado sendo este caracterizado pela desaceleração das reações de descarboxilação oxidativa inerentes ao ciclo do ácido tricarboxílico, sobreposição de centros enzimáticos associados à via glicolítica, em especial a lactato desidrogenase e, significativa supressão no metabolismo oxidativo mitocondrial (BEZERRA et al., 1999; TUNHOLI-ALVES et al., 2014). Segundo Hoch (1992), alterações relacionadas à função mitocondrial poderiam em parte estar associadas à composição da membrana plasmática desta organela. Para o mesmo autor, fosfolipídios específicos de membrana, como a cardiolipina, são requeridos para a ativação de uma grande variedade de enzimas e transportadores presentes na membrana mitocondrial.



**Figura 8** Esquemas que ilustram as reações que integram o ciclo do ácido cítrico e a fosforilação oxidativa em condições fisiológicas. Fonte: STRYER et al. (2004).

Stuart et al. (1998) em estudo experimental observaram significativas alterações na estrutura e função de mitocôndrias de *Cepaea nemoralis* (Linnaeus, 1758) estivadas. A supressão do metabolismo oxidativo verificado nos moluscos estivados é reflexo da redução da atividade da citocromo-c oxidase, que pode ser explicada como consequência a variações nos conteúdos de fofolípídios mitocondriais. Em adição, a diminuição da densidade mitocondrial registrada no complexo gônada-glândula digestiva (DGG) de moluscos estivados ajuda a justificar a supressão de reações aeróbias nestes organismos.

Alteração na fisiologia mitocondrial do gastrópode *Helix aspersa* submetido a condições de jejum tem sido documentada (BISHOP, 2002). Para os autores, a redução no metabolismo oxidativo aeróbio apresentado pelos moluscos deprimidos metabolicamente (em jejum) pode ser explicado ou em decorrência a “down regulation” temporária de centros enzimáticos relacionados ao ciclo de Krebs (citrato sintase) e a cadeia transportadora de elétrons (citocromo c oxidase), sendo restabelecido com o retorno da capacidade metabólica, ou como consequência a diminuição no número de mitocôndrias nestes moluscos.

Mohamed e Ishak (1982) avaliaram a influência da infecção de *S. mansoni* sobre as atividades da succinato oxidase, da NADH oxidase e da citocromo-c oxidase de *B. alexandrina* e *Bulinus truncatus*. Os resultados revelaram que a infecção reduz a capacidade de ambos os hospedeiros intermediários em realizarem reações oxidativas aeróbias repercutindo com acúmulo de oxaloacetato. Para os pesquisadores, o estabelecimento desta condição metabólica verificada nos moluscos infectados resulta a partir da ação dos produtos de secreção/excreção de larvas do parasito em desenvolvimento, que atuam suprimindo centros enzimáticos que integram a cadeia respiratória dos moluscos hospedeiros.

#### **2.3.4 Alterações fisiológicas verificadas durante a interface *Biomphalaria glabrata*/*Echinostoma paraensei***

Espécimes de trematódeos digenéticos apresentam um ciclo de vida heteroxeno utilizando moluscos como hospedeiros intermediários. Esta fase inicial é essencial ao desenvolvimento do parasito, possibilitando-o atingir estágios infectantes ao hospedeiro definitivo (MALDONADO et al., 2001). Como consequência, alterações fisiológicas em moluscos são observadas, já que as larvas acabam utilizando substâncias que seriam utilizadas

como nutrientes pelo hospedeiro, causando-lhe um desequilíbrio nutricional semelhante aquele gerado durante período de jejum (PINHEIRO; AMATO, 1994). Segundo Fried et al. (1998), além da competição por substratos verificada entre o parasito e o molusco, as larvas em desenvolvimento eliminam no interior do organismo hospedeiro, os seus produtos de degradação que interferem no metabolismo normal do molusco hospedeiro. Nos últimos anos, resultados sinalizam a ausência de um padrão de variação metabólica em moluscos infectados, destacando a necessidade de mais estudos para melhor entendimento destes eventos, possibilitando o desenvolvimento de medidas direcionadas no controle do hospedeiro intermediário e, por conseguinte, de doenças por ele transmitidas.

Estudos prévios realizados por Tunholi et al. (2011a) tem demonstrado alterações na biologia reprodutiva de *B. glabrata* infectada por diferentes cargas miracidiais de *E. paraensei*. Como principais resultados, a infecção causou aumento significativo, em média, na taxa ovipositória dos moluscos infectados com 5 ( $32,381 \pm 4,741$  ovos/molusco) e 50 ( $38,516 \pm 5,659$  ovos/molusco) miracídeos, em comparação ao grupo não-infectado ( $12,107 \pm 4,195$  ovos/molusco). Mesma ordem de variação foi demonstrada para o número de massas ovíferas/moluscos, com os grupos infectados apresentando valores em média superiores ao grupo controle. Entretanto, quando se avaliou a taxa de viabilidade dos ovos postos, moluscos parasitados apresentaram menor eclodibilidade em relação ao grupo controle. Estes dados indicam que quando infectado o molusco hospedeiro é capaz de aumentar sua atividade reprodutiva, sugerindo uma estratégia ecológica como tentativa de manutenção da espécie no meio ambiente.

Autores têm ainda verificado que a infecção por *E. paraensei* altera as concentrações de cálcio na hemolinfa e concha de *B. glabrata* (TUNHOLI et al., 2011c). Decréscimo significativo nos conteúdos de íons cálcio na concha foi verificado em ambos os grupos infectados (5 e 50 miracídeos), coincidindo com o aumento da calcemia nestes hospedeiros. Os resultados demonstram a existência de uma via homeostática estabelecida entre concha e hemolinfa voltada na regularização do conteúdo hemolinfático de cálcio no organismo do molusco hospedeiro quando este é exposto a condições de infecção e, que o metabolismo de cálcio depende da dose miracidial utilizada, uma vez que as maiores necessidades energéticas e danos celulares são observadas nos organismos com alta parasitemia.

No mesmo ano, Tunholi et al. (2011b) avaliaram o efeito da infecção por *E. paraensei* sobre as atividades das enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e conteúdos de proteínas totais, ácido úrico e uréia na hemolinfa de *B. glabrata* após

exposição a 5 e 50 miracídios. Foi observado decréscimo significativo nas concentrações de proteínas totais, aumento dos produtos nitrogenados de excreção, bem como aumento das atividades das aminotransferases nos moluscos expostos a ambas as cargas miracidiais. A elevação da atividade da ALT observada na hemolinfa dos moluscos após a infecção com 50 miracídios sugere maior requerimento energético destes em relação àqueles infectados por cinco miracídios. Em adição, tais resultados ainda indicam utilização de proteínas totais como substrato alternativo na manutenção glicêmica nos organismos hospedeiros, uma vez que, aumento da formação de catabólitos nitrogenados (uréia e ácido úrico) foi verificado em conformidade com elevação das atividades das aminotransferases, frequentemente relacionada à condição de injúria tecidual. Isto pode ser explicado em decorrência à penetração dos miracídios e subsequente desenvolvimento de esporocistos, rédias e cercárias durante o período pré-patente de desenvolvimento do trematódeo.

Variações nos níveis lipídicos em *B. glabrata* infectadas com diferentes doses miracidiais de *E. paraensei* foram também verificadas (TUNHOLI-ALVES et al., 2011a). Em relação aos conteúdos hemolinfáticos de colesterol e triacilglicerol, os resultados demonstraram que a infecção pelo equinostomatídeo provoca decréscimo significativo nos conteúdos de ambos os substratos, com menores valores registrados na primeira semana de infecção. A diminuição do conteúdo destes lipídeos nos moluscos infectados indica intensa utilização destes substratos tanto pelo hospedeiro intermediário quanto pelo parasito, sugerindo sua provável participação no metabolismo energético e construção estrutural das larvas em desenvolvimento. O perfil de lipídeos neutros no complexo gônada-glândula digestiva (DGG) apresentou alterações relevantes, indicando que neste modelo, o metabolismo de lipídios é dependente da dose miracidial usada.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral:

➤ Avaliar as possíveis alterações referentes aos metabolismos glicídico e oxidativo de *B. glabrata* infectadas por duas doses miracidiais (5 e 50) de *E. paraensei* durante o período de quatro semanas de infecção.

#### 3.2 Objetivos Específicos:

➤ Verificar possíveis alterações no metabolismo oxidativo de carboidratos em *B. glabrata* infectadas por *E. paraensei*.

➤ Identificar os níveis de ácidos carboxílicos (succínico, oxálico, pirúvico e láctico) na hemolinfa de *B. glabrata* infectadas por diferentes doses miracidiais de *E. paraensei*.

➤ Verificar o metabolismo oxidativo mitocondrial de *B. glabrata* infectada por *E. paraensei*.

## 4 CAPÍTULO I

**TRANSIÇÃO DO METABOLISMO AERÓBIO PARA ANAERÓBIO EM *Biomphalaria glabrata* (MOLLUSCA, GASTROPODA) INFECTADAS COM DIFERENTES DOSES MIRACIDIAIS DE *Echinostoma paraensei* (TREMATODA, ECHINOSTOMATIDAE) POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA-EFICIÊNCIA.**

TRANSIÇÃO DO METABOLISMO AERÓBIO PARA ANAERÓBIO EM *Biomphalaria glabrata* (MOLLUSCA, GASTROPODA) INFECTADAS COM DIFERENTES DOSES MIRACIDIAIS DE *Echinostoma paraensei* (TREMATODA, ECHINOSTOMATIDAE) POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA-EFICIÊNCIA.

**RESUMO**

O conteúdo de glicose na hemolinfa e de glicogênio na glândula digestiva e massa cefalopediosa de *Biomphalaria glabrata* expostas a diferentes cargas parasitárias (5 ou 50 miracídios) de *Echinostoma paraensei*, bem como, a atividade da lactato desidrogenase foram avaliados. Análises por HPLC (cromatografia líquida de alta-eficiência) foram também realizadas para determinar as concentrações de quatro ácidos orgânicos (oxálico, succínico, pirúvico e láctico) presentes na hemolinfa de moluscos infectados e não-infectados, para melhor compreender o efeito da infecção sobre o metabolismo energético/oxidativo do hospedeiro. Após uma, duas, três e quatro semanas de infecção os moluscos foram dissecados para coleta da hemolinfa e separação dos tecidos. Foi observada alteração na glicemia dos moluscos, em ambas as situações de parasitismo, com significativo aumento dos níveis de glicose verificado a partir da terceira semana pós infecção quando comparado ao grupo controle. Alterações foram também observadas em relação à atividade da lactato desidrogenase, sendo caracterizadas pelo aumento de sua atividade nos períodos mais tardios da infecção. Paralelamente, verificou-se um decréscimo no conteúdo de glicogênio nos tecidos de armazenamento, sendo tal redução drasticamente maior na glândula digestiva (sítio de desenvolvimento larval), em comparação à massa cefalopediosa. Em adição, a infecção por ambas as doses miracidiais resultou em um aumento dos níveis de ácidos oxálico e láctico, bem como em um declínio nos níveis de ácidos pirúvico e succínico em *B. glabrata* como consequência da redução da taxa de descarboxilação oxidativa do ciclo do ácido tricarboxílico e da aceleração do processo de degradação anaeróbia de carboidratos nos moluscos, através da fermentação láctica, que é essencial para garantir a obtenção de energia e o sucesso da infecção.

**Palavras-chaves:** Gastropoda, glicose, glicogênio, lactato desidrogenase, ácidos orgânicos.

**ABSTRACT**

The glucose content in the hemolymph and glycogen content in the digestive gland–gonad complex (DGG) and cephalopodal mass of *Biomphalaria glabrata* exposed to different parasite doses (5 or 50 miracidia) of *Echinostoma paraensei* as well as the activity of lactate dehydrogenase were evaluated. HPLC (high-performance liquid chromatography) analyses were also performed to determine the concentrations of four organic acids (oxalic, succinic, pyruvic and lactic) present in the hemolymph of infected and uninfected snails, to better understand the effect of infection on the host's energetic/oxidative metabolism. The snails were dissected 1–4 weeks after infection to collect the hemolymph and separate the tissues. There was alteration in the glycemia of the snails at both parasite doses, with a significant increase of glycemia from the third week after infection in comparison to the control group. Changes were also observed in the lactate dehydrogenase activity, with increased activity as the infection progressed. In parallel, there was a decrease in the glycogen content in the storage tissues, with a markedly greater reduction in the digestive gland–gonad complex (larval development site) in comparison with the cephalopodal mass. Additionally, the infection by both miracidial doses resulted in an increase of oxalic and lactic acid levels, as well as in a decline of pyruvic and succinic acid levels in *B. glabrata*, thus explaining the reduction of the oxidative decarboxylation rate in the tricarboxylic acid cycle and acceleration of the anaerobic degradation of carbohydrates in the snails, through lactic fermentation, which is essential to ensure energy supply and success of the infection.

**Keywords:** Gastropoda, glucose, glycogen, lactate dehydrogenase, organic acids

## 4.1 INTRODUÇÃO

Moluscos apresentam predominantemente metabolismo aeróbico para obtenção de energia. Entretanto, quando submetidos a condições fisiológicas adversas, como o parasitismo por larvas de trematódeos, podem redirecionar seu fluxo metabólico. Um exemplo disto é a desaceleração de reações oxidativas do ciclo do ácido tricarboxílico observada em *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) infectada por larvas de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 (BEZERRA et al., 1997), um mecanismo que possibilita a sobrevivência do molusco infectado.

Estudos realizados por White et al. (2005), Bandstra et al. (2006) e Pinheiro et al., (2009) sobre as alterações metabólicas que ocorrem em moluscos submetidos à infecção por larvas de trematódeos têm demonstrado diferentes padrões de resposta. As diferenças observadas nestes estudos não são apenas decorrentes dos mecanismos intrínsecos desenvolvidos por cada espécie de parasito e hospedeiro, mais também de vários outros fatores, tais como o uso de diferentes doses miracidiais (SLUITERS et al., 1980; VASQUEZ; SULLIVAN, 2001; TUNHOLI et al., 2011a) e do tempo de duração do experimento (BANDSTRA et al., 2006). Resultados prévios obtidos por nosso grupo têm demonstrado que algumas frações de lipídios neutros no complexo gônada-glândula digestiva (DGG), juntamente com os conteúdos de cálcio na hemolinfa e concha de *B. glabrata* infectadas por *Echinostoma paraensei* (LIE; BASCH, 1967) são alterados em resposta a dose miracidial usada (TUNHOLI-ALVES et al., 2011; TUNHOLI et al., 2011c). Apesar destes estudos, não existem informações disponíveis sobre alterações no metabolismo de carboidratos de *B. glabrata* utilizando diferentes doses miracidiais de *E. paraensei*, bem como os efeitos desta relação sobre as concentrações de ácidos carboxílicos nos moluscos infectados. Como verificado por Massa et al. (2007), certos ácidos carboxílicos estão diretamente envolvidos no metabolismo intermediário de moluscos. Além disto, estes metabólitos podem ainda serem utilizados como substratos para o desenvolvimento de larvas de trematódeos. Assim, a caracterização das alterações nas concentrações destes ácidos fornecerá informações importantes em relação aos eventos necessários para o sucesso da infecção de *E. paraensei* em *B. glabrata*.

*Echinostoma paraensei* é uma espécie brasileira de equinostomatídeo descrita por Lie e Basch (1967) obtidos de *B. glabrata* naturalmente infectadas provindas do estado de Minas Gerais, Brasil. Maldonado et al. (2001) identificaram como hospedeiro definitivo natural, o

roedor *Nectomys squamipes* (Brants, 1827) e propuseram o ciclo de vida do parasito em condições naturais.

Contudo as propostas do presente estudo foram analisar pela primeira vez as concentrações de glicogênio na glândula digestiva e massa cefalopediosa, assim como o conteúdo de glicose e atividade das enzimas D- e L-lactato desidrogenase (EC 1.1.1.27 e EC 1.1.1.28) (LDH) na hemolinfa de *B. glabrata* submetidas a infecções por 5 ou 50 miracídios de *E. paraensei* durante quatro semanas, considerado o período pré-patente de desenvolvimento intra-molusco deste parasito (LIE; BASCH, 1967). Adicionalmente, utilizando análises de HPLC, determinamos as concentrações de ácidos orgânicos, intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico, na hemolinfa de moluscos infectados e não-infectados. Análises histoquímicas (PAS) da glândula digestiva de moluscos infectados e não infectados foram também realizados, afim de melhor caracterizar as possíveis alterações no metabolismo glicídico nestes organismos e comparar então com os resultados encontrados na literatura.

## **4.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.2.1 Obtenção de miracídios de *Echinostoma paraensei***

Hamsters, *Mesocricetus auratus* Waterhouse, 1839, criados em laboratório com quatro meses de idade foram infectados por via gástrica com 50 metacercárias de *E. paraensei*. Quatro semanas após a infecção, os hamsters foram eutanaziados em câmara de CO<sub>2</sub> (Comitê de Ética para Uso Animal, CEUA L-074/08) e necropsiados para obtenção dos helmintos adultos de *E. paraensei* do intestino delgado do hospedeiro. Os helmintos tiveram o útero dissecado para liberação dos ovos. Esses foram então incubados em água destilada e mantidos em estufa B.O.D. a 26°C por 14 dias. Após este período, os ovos foram expostos à luz (100W) para estimular a eclosão e concentração dos miracídios (PINHEIRO et al., 2004a, b, 2005).

### **4.2.2 Manutenção dos moluscos e formação dos grupos**

Em cada aquário foram previamente colocados 1500ml de água destilada onde era acrescentado cerca de 0,5g de CaCO<sub>3</sub>. Esta água era renovada uma vez por semana. Doze grupos foram formados: quatro grupos controle (não infectados), quatro grupos de moluscos infectados com cinco miracídios cada e quatro grupos de moluscos infectados com 50 miracídios cada. Cada aquário era composto por 10 moluscos sendo todo experimento realizado em duplicata, utilizando um “n” total de 240 moluscos. Estas doses (5 e 50

miracídios) foram usadas para caracterizar baixa e alta parasitemia, uma vez que na natureza não há controle deste parâmetro e o sucesso da infecção está relacionado com a presença e número de moluscos e miracídios (TUNHOLI et al., 2011a,c).

A alimentação dos moluscos foi feita com folhas de alface (*Lactuca sativa* L.) *ad libitum*. A manutenção dos aquários foi realizada em dias alternados, quando as folhas de alface eram renovadas, evitando sua fermentação no interior dos mesmos. O número de moluscos mortos também foi um critério observado e contabilizado.

#### **4.2.3 Obtenção de *Biomphalaria glabrata* (isolado Sumidouro, RJ.) e infecção experimental**

Os espécimes de moluscos foram obtidos a partir da criação mantida no Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil. Moluscos apresentando cerca de 8 a 12 mm de diâmetro de concha foram individualmente colocados em placa de 24 furos onde os miracídios foram colocados previamente com o auxílio de uma micropipeta, proporcionando uma infecção individual de cinco (5) ou cinquenta (50) miracídios por molusco (TUNHOLI et al., 2011a,c). Os moluscos de cada grupo foram individualmente examinados sob esteromicroscópio durante o período de exposição para detectar presença ou ausência dos miracídios nas placas. Após 24 horas de exposição, não haviam miracídios livres nadando nas placas.

Os moluscos foram então removidos das placas e transferidos para os aquários. Somente aqueles moluscos que albergavam esporocistos de *E. paraensei* em seus respectivos sistemas circulatórios foram selecionados para estudos adicionais, uma vez que esporocistos já são visíveis em dois dias pós-infecção (LOKER; HERTEL, 1987).

#### **4.2.4 Dissecção dos moluscos e coleta da hemolinfa e tecidos**

Semanalmente pós-infecção, a hemolinfa foi coletada por punção cardíaca de moluscos randomicamente escolhidos de cada grupo experimental (n=20). Em seguida, tais organismos foram dissecados para coleta da glândula digestiva e massa cefalopediosa. Todas as amostras foram mantidas em banho de gelo durante as dissecções. Após a separação dos tecidos estes foram pesados e congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$ . O tecido hemolinfático foi conservado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento das análises espectrofotométricas.

#### 4.2.5 Determinações bioquímicas de glicose, glicogênio e atividade da LDH em *Biomphalaria glabrata* infectadas por *Echinostoma paraensei*.

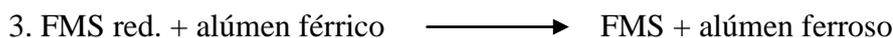
As determinações bioquímicas de glicose e atividade da LDH foram feitas na hemolinfa total dos moluscos utilizando *kits* para diagnóstico laboratorial (Doles<sup>®</sup>).

Para a determinação de glicose 10µl de amostra foram adicionados a 1ml do reagente de cor (solução tampão de fosfatos 0,05M, pH 7,45 ± 0,1; aminoantipirina 0,03mM e 15mM de p-hidroxibenzoato de sódio; um mínimo de 12kU de glucose oxidase; e, 0,8 kU de peroxidase por litro). Neste meio ocorrem as seguintes reações:



O produto formado pela oxidação de 4-aminoantipirina (4-antipirilquinonimina) é de coloração avermelhada e sua intensidade diretamente proporcional à concentração de glicose na solução. A cor avermelhada, formada pela reação, é medida em espectrofotômetro, com absorção máxima em 510nm, utilizando solução aquosa de glicose 100mg/dl.

Para a determinação da atividade da lactato desidrogenase foram misturados 1ml da solução de substrato (solução 0,1M de lactato, 0,005M de o-fenantrolina em Tris 0,2M pH 8,8), uma gota de solução 0,012M de Sulfato de Ferro amoniacal (alúmen férrico) e 25µl de amostra, sendo a mistura incubada a 37 °C por 2 minutos. A seguir foi acrescentada uma gota de solução contendo solução 15,82mmolar de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) e 3,73mmolar de fenazina metassulfato (FMS), sendo a mistura incubada a 37°C por 5 minutos. A reação final foi estabilizada pela adição de 1 ml de solução de ácido clorídrico 0,5M. Neste meio ocorre à seguinte sequência de reações:



Após homogeneização, a absorbância foi lida em espectrofotômetro em 510nm, contra o branco de reação e usando uma solução de LDH 350U./l como padrão.

Os conteúdos de glicogênio nos tecidos da glândula digestiva e massa cefalopodia foram determinados segundo o método 3,5 DNS (PINHEIRO; GOMES, 1994) sendo

expressos em mg de glicose/g de tecido peso fresco.

#### **4.2.6 Determinação dos conteúdos hemolinfáticos de ácidos carboxílicos**

##### **4.2.6.1 Preparo das soluções padrão**

Padrões dos ácidos (oxálico, succínico, láctico e pirúvico) foram adquiridos apartir Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha), no maior grau de pureza disponível. Acetonitrila, dihidrogenofosfato de sódio e ácido fosfórico utilizados no presente estudo foram de grau analítico para uso cromatográfico. Água ultrapura foi obtida do sistema de purificação Milli-Qwater (Millipore, Bedford, MA, EUA). As soluções (padrão) foram dissolvidas em fase móvel e o tampão fosfato foi ajustado para pH 2,2 com ácido fosfórico, e armazenadas a 4 °C.

##### **4.2.6.2 Análises por CLAE**

Todo experimento de CLAE foram realizados no sistema Shimadzu LC-20AT equipado com detector de arranjo de fotodiodos (PDA; SPD-M20A, Shimadzu, Japão), acoplados a um sistema de processamento de dados ChemStation LCSolution. As separações foram realizadas com coluna de fase reversa C18 (150 × 4.5 mm I.D., 5 µm, Allure® Organic Acids, Restek) em condições isocráticas. A fase móvel consistiu em 1% de acetonitrila em 20 mol.L<sup>-1</sup> e solução aquosa de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, ajustado para pH 2.2 com H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. A temperatura foi fixada a 36 °C e a taxa de fluxo usada foi de 0,8 ml/min. Os cromatogramas foram monitorizados a 210nm e o volume de injeção foi de 20 µl. A identificação dos ácidos orgânicos presentes nas amostras foi baseada numa comparação dos espectros UV e os tempos de retenção das soluções padrão. A quantificação foi efetuada com base nas parcelas de calibração lineares de área de pico em relação à concentração. Linhas de calibragem foram construídas com base em cinco níveis de concentração de soluções padrão. Os gráficos de calibração para ácidos (oxálico, succínico, pirúvico e láctico) foram lineares (r = 0,99), em todos os casos. Todo o experimento foi realizado em triplicado. A hemolinfa foi submetida ao vórtice e centrifugada durante 10 min a 2520 g. O sobrenadante foi separado e as partículas não dissolvidas foram removidas por filtração utilizando filtros de membrana de 45 µl. Alíquotas de 20 µl foram utilizadas para a análise cromatográfica.

##### **4.2.7 Análises histoquímicas**

Moluscos de cada período de infecção foram dissecados para remoção da concha e em seguida foram transferidos para o fixador Duboscq-Brasil (FERNANDES, 1949). Os tecidos

moles foram processados de acordo com as rotinas de técnicas histológicas (HUMASON, 1979). As secções (5µm) foram coradas usando PAS e observadas em microscópio de luz Zeiss AxioCam. Imagens foram capturadas com uma câmara digital MRc5 AxioCam e processadas com o software Axiovision.

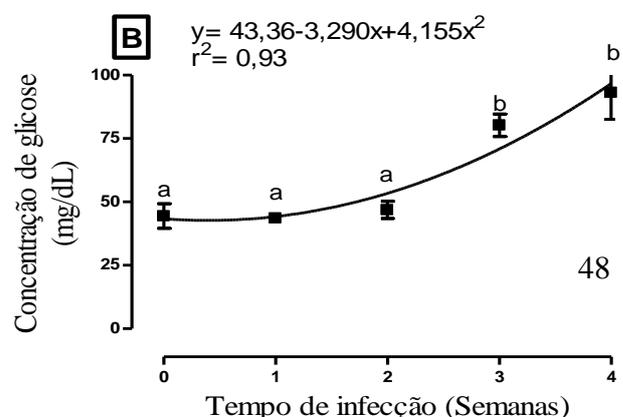
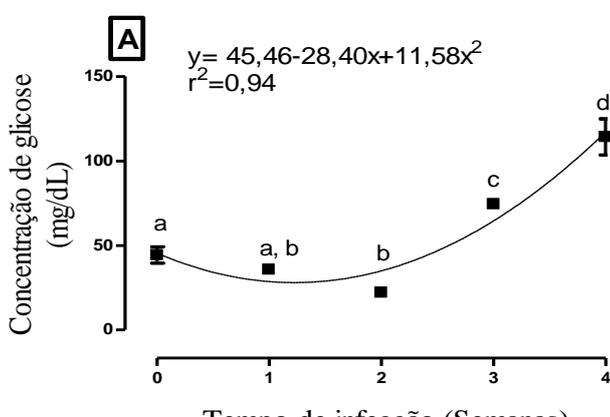
#### 4.2.8 Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram expressos como média ± desvio-padrão da média e submetidos ANOVA one-way com pós-teste de Tukey-Kramer ( $\alpha=5\%$ ) para comparação das médias. A regressão polinomial foi calculada para analisar a relação existente entre os valores obtidos e o tempo de infecção ( $P < 0,05$ ) (InStat, GraphPad, v.4.00, Prism, GraphPad, v.3.02, Prism Inc.).

### 4.3 RESULTADOS

#### 4.3.1 Determinação da concentração de glicose e atividade da LDH

Alterações na glicemia de moluscos infectados foram demonstradas com uma significativa relação entre o tempo de infecção e concentração de glicose na hemolinfa de moluscos infectados por 5 ( $r^2=0,94$ ) e 50 ( $r^2=0,93$ ) miracídios (Fig. 1A e B). No entanto, aumento significativo dos conteúdos de glicose nos grupos infectados só foi observado a partir da terceira semana de infecção para os espécimes infectados com 5 ( $74,56\pm 0,56$ ) e 50 miracídios ( $80,24\pm 4,41$ ), quando comparado ao grupo controle ( $44,36\pm 4,79$ ) (Tabela 1).



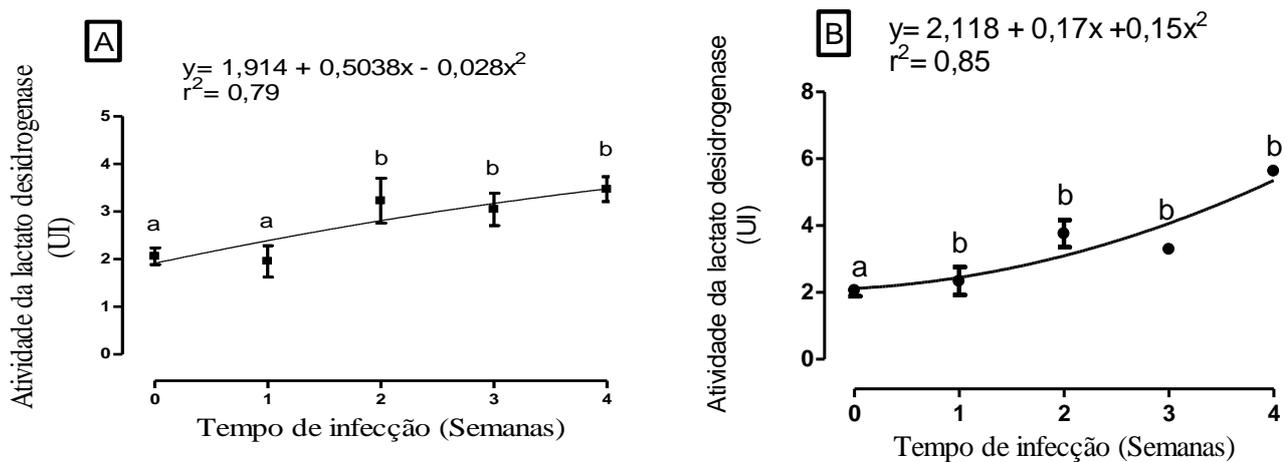
**Figura 1.** Relação entre a concentração de glicose, expresso em mg/dl, na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* infectados por 5 (A) e 50 (B) miracídios de *Echinostoma paraensei* e o tempo, expresso em semanas. 0 (zero) semana de infecção representa a média dos moluscos do grupo controle dissecados após o final de cada período experimental (1, 2, 3 e 4 semanas). a, b, c = Médias diferem significativamente entre si. (média±desvio padrão).

Mudanças na atividade da LDH foram também observadas em ambos os grupos de moluscos infectados (Tabela 1). No grupo exposto a dose de 5 miracídios, o menor valor registrado foi após a primeira semana de infecção ( $1,95 \pm 0,33$ ) não se diferenciando estatisticamente em relação ao grupo controle ( $2,09 \pm 0,17$ ). Porém, com o avançar da infecção, um aumento significativo da atividade da LDH foi caracterizado, com o maior valor verificado na quarta semana de infecção ( $3,47 \pm 0,26$ ) (Fig. 2A), representando um aumento de 70%. Mesma ordem de variação foi demonstrada nos grupos expostos à dose de 50 miracídios, sendo o maior valor notado após a quarta semana de infecção ( $5,63 \pm 0,15$ ), correspondendo um acréscimo de aproximadamente 175,40% em relação ao grupo controle ( $2,04 \pm 0,17$ ) (Fig. 2B).

**Tabela 1.** Atividade da lactato desidrogenase (LDH) (UI) e concentração de glicose (miligramas por decilitro) na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* infectada experimentalmente com 5 e 50 miracidios de *Echinostoma paraensei*. <sup>a, b, c</sup> = Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente em relação ao grupo controle a cada semana experimental,  $P < 0.05$ , (média±SD).

Semanas	Atividade da lactato desidrogenase (UI)					Concentração de glicose (mg/dL)						
	Controle		5		50		Controle		5		50	
	X±SD	X±SD	%	X±SD	%	X±SD	X±SD	%	X±SD	%		
1	2,09±0,17 <sup>a</sup>	1,95±0,33 <sup>a</sup>	-6,86	2,34±0,42 <sup>a</sup>	11,91	43,97±4,80 <sup>a</sup>	35,74±0,26 <sup>a</sup>	-18,71	43,58±1,19 <sup>a</sup>	-0,88		
2	2,04±0,17 <sup>a</sup>	3,22±0,47 <sup>b</sup>	57,74	3,76±0,41 <sup>b</sup>	84,07	44,29±4,12 <sup>a</sup>	22,09±3,08 <sup>b</sup>	-50,10	46,85±3,40 <sup>a</sup>	5,78		
3	2,05±0,17 <sup>a</sup>	3,04±0,34 <sup>b</sup>	48,05	3,29±0,17 <sup>b</sup>	60,20	44,36±4,79 <sup>a</sup>	74,56±0,56 <sup>b</sup>	68,09	80,24±4,41 <sup>b</sup>	80,89		
4	2,04±0,17 <sup>a</sup>	3,47±0,26 <sup>b</sup>	69,68	5,63±0,15 <sup>b</sup>	175,40	45,02±5,73 <sup>a</sup>	114,25±10,73 <sup>b</sup>	153,79	93,08±10,58 <sup>b</sup>	106,76		





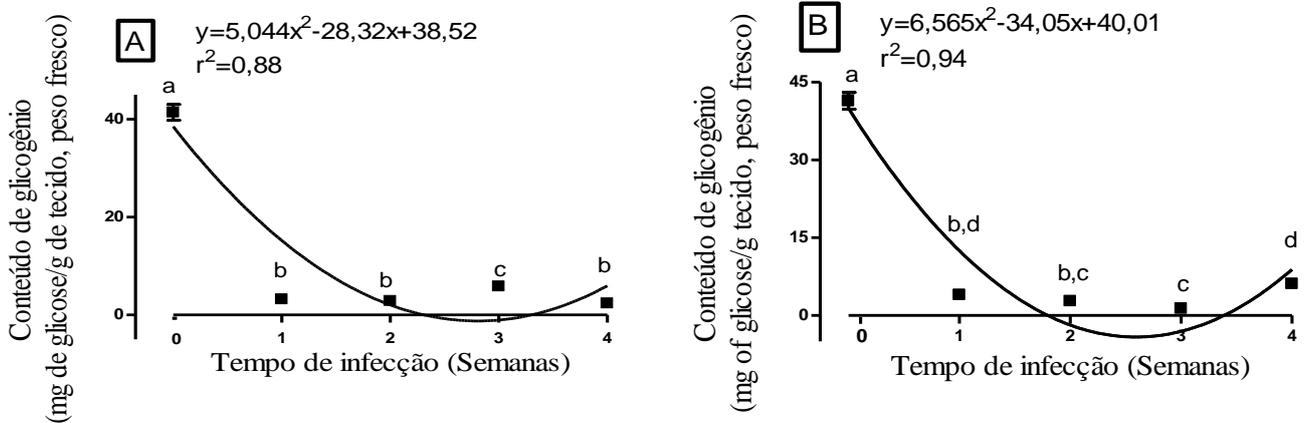
**Figura 2.** Relação entre a atividade da lactato desidrogenase, expresso em UI, na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* infectados por 5 (A) e 50 (B) miracídeos de *Echinostoma paraensei* e o tempo, expresso em semanas. 0 (zero) semana de infecção representa à média dos moluscos do grupo controle dissecados após o final de cada período experimental (1, 2, 3 e 4 semanas). a, b, c = Médias diferem significativamente entre si. (média±desvio padrão).

#### 4.3.2 Determinação da concentração de glicogênio

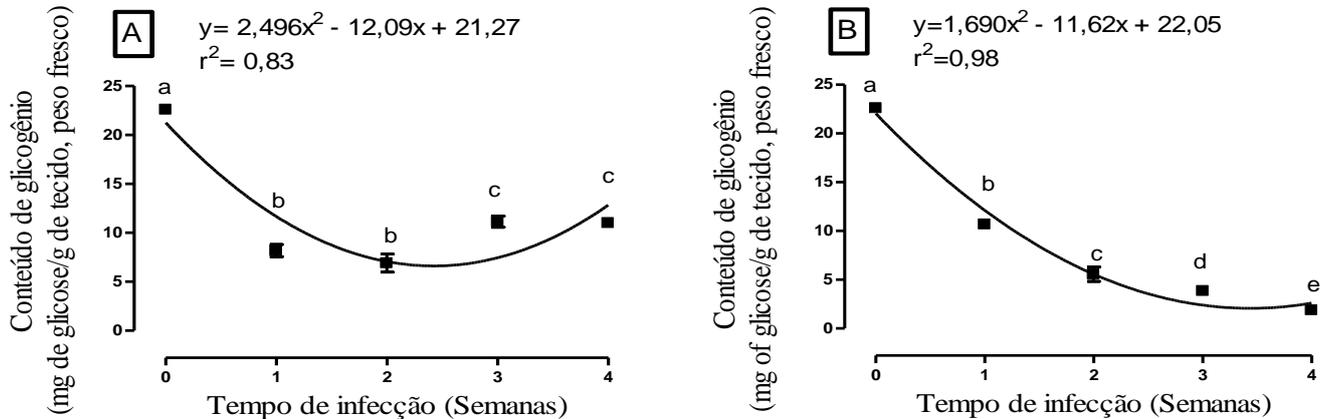
Para melhor compreender as alterações da glicemia dos moluscos infectados, determinamos os conteúdos de glicogênio na glândula digestiva-gônada e massa cefalopodia do hospedeiro. Em relação ao conteúdo de glicogênio na glândula digestiva de *B. glabrata* infectadas, o menor valor foi verificado na quarta semana pós-infecção para moluscos expostos a 5 miracídeos ( $2,37 \pm 0,18$ ) (Fig. 3A), e na terceira semana para o grupo infectado por 50 miracídeos ( $1,38 \pm 0,19$ ). Os resultados aqui apresentados denunciam uma resposta dose-dependente, uma vez que moluscos expostos a maior dose miracidial desenvolveram as alterações mais severas. Em ambos os casos as médias diferenciaram significativamente em relação à média do grupo controle ( $41,41 \pm 1,61$ ) ao longo das quatro semanas de infecção (Fig. 3B) (Tabela 2).

O conteúdo de glicogênio na massa cefalopodia de *B. glabrata* infectadas por 5 e 50 miracídeos apresentaram diferenças significativas em relação à média do conteúdo do grupo controle (Tabela 2). Ocorreu decréscimo de 50,30% no conteúdo de glicogênio na massa cefalopodia nos moluscos infectados por 5 miracídeos após a quarta semana de infecção ( $11,00 \pm 0,41$ ), em relação a média do grupo controle ( $22,15 \pm 0,30$ ), entretanto o menor valor foi observado na segunda semana de infecção ( $6,91 \pm 0,92$ ) diferindo significativamente do verificado na quarta semana (Fig.4A). Do mesmo modo, a infecção por 50 miracídeos

promoveu uma redução na concentração de glicogênio de 91,51% no final da quarta semana após infecção ( $1,880 \pm 0,2487$ ) (Fig.4B).



**Figura 3.** Relação entre o conteúdo de glicogênio, expresso em mg de glicose/g de tecido, peso fresco), na glândula digestiva-gônada de *Biomphalaria glabrata* infectados por 5 (A) e 50 (B) miracídeos de *Echinostoma paraensei* e o tempo, expresso em semanas. 0 (zero) semana de infecção representa à média dos moluscos do grupo controle dissecados após o final de cada período experimental (1, 2, 3 e 4 semanas). a, b, c = Médias diferem significativamente entre si. (média±desvio padrão).



**Figura 4.** Relação entre o conteúdo de glicogênio, expresso em mg de glicose/g de tecido, peso fresco), na massa cefalopediosa de *Biomphalaria glabrata* infectados por 5 (A) e 50 (B) miracídeos de *Echinostoma paraensei* e o tempo, expresso em semanas. 0 (zero) semana de infecção representa à média dos moluscos do grupo controle dissecados após o final de cada período experimental (1, 2, 3 e 4 semanas). a, b, c = Médias diferem significativamente entre si. (média±desvio padrão).

**Tabela 2.** Conteúdo de glicogênio na glândula digestiva-gônada e massa cefalopediosa, expresso em mg de glicose/ g de tecido, em peso fresco, em *Biomphalaria glabrata* infectada experimentalmente com 5 e 50 miracidios de *Echinostoma paraensei*. <sup>a, b, c</sup> = Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente em relação ao grupo controle a cada semana experimental,  $P < 0.05$ , (média±SD).

Conteúdo de glicogênio (mg de glicose/g de tecido, peso fresco)												
Semanas	Complexo glândula digestiva-gônada					Massa cefalopediosa						
	Controle		5		50		Controle		5		50	
	X±SD		X±SD	%	X±SD	%	X±SD		X±SD	%	X±SD	%
1	39,98±1,58 <sup>a</sup>		3,24±0,26 <sup>b</sup>	-91,89	3,99±0,18 <sup>b</sup>	-90,00	23,01±0,27 <sup>a</sup>		8,18±0,63 <sup>b</sup>	-64,43	10,67±0,18 <sup>b</sup>	-53,60
2	41,39±1,47 <sup>a</sup>		2,89±0,49 <sup>b</sup>	-93,01	2,78±0,02 <sup>b</sup>	-93,27	22,58±0,42 <sup>a</sup>		6,91±0,92 <sup>b</sup>	-69,39	5,56±0,73 <sup>b</sup>	-75,34
3	41,37±1,63 <sup>a</sup>		5,86±0,48 <sup>b</sup>	-85,83	1,38±0,19 <sup>b</sup>	-96,66	22,62±0,37 <sup>a</sup>		11,14±0,56 <sup>b</sup>	-50,74	3,84±0,05 <sup>b</sup>	-83,01
4	42,10±1,76 <sup>a</sup>		2,37±0,18 <sup>b</sup>	-94,37	6,13±0,33 <sup>b</sup>	-85,44	22,15±0,30 <sup>a</sup>		11,00±0,41 <sup>b</sup>	-50,30	1,88±0,24 <sup>b</sup>	-91,51

### 4.3.3 Análises de HPLC

Após verificarmos as alterações acima, focamos nossas análises na determinação do possível efeito da infecção sobre as concentrações de alguns ácidos orgânicos em *B. glabrata*. A infecção por ambas as doses miracidiais resultou em um aumento do conteúdo de ácido oxálico. A concentração de ácido oxálico aumentou 61,07% nos moluscos infectados com cinco miracídeos na terceira semana após infecção ( $47,79 \pm 0,15 \text{mM}$ ) em relação ao grupo controle ( $29,67 \pm 0,77 \text{mM}$ ). Este aumento foi mais pronunciado nos organismos infectados com 50 miracídeos no mesmo período de infecção ( $89,77 \pm 1,65 \text{mM}$ ). Variação similar foi observada para a concentração de ácido láctico nos grupos infectados, com aumento de 401,25% nos moluscos infectados com cinco miracídeos e 500,05% para moluscos infectados com 50 miracídeos após a terceira semana de infecção, em relação à média do grupo controle ( $37,37 \pm 4,38 \text{mM}$ ) (Tabela 3).

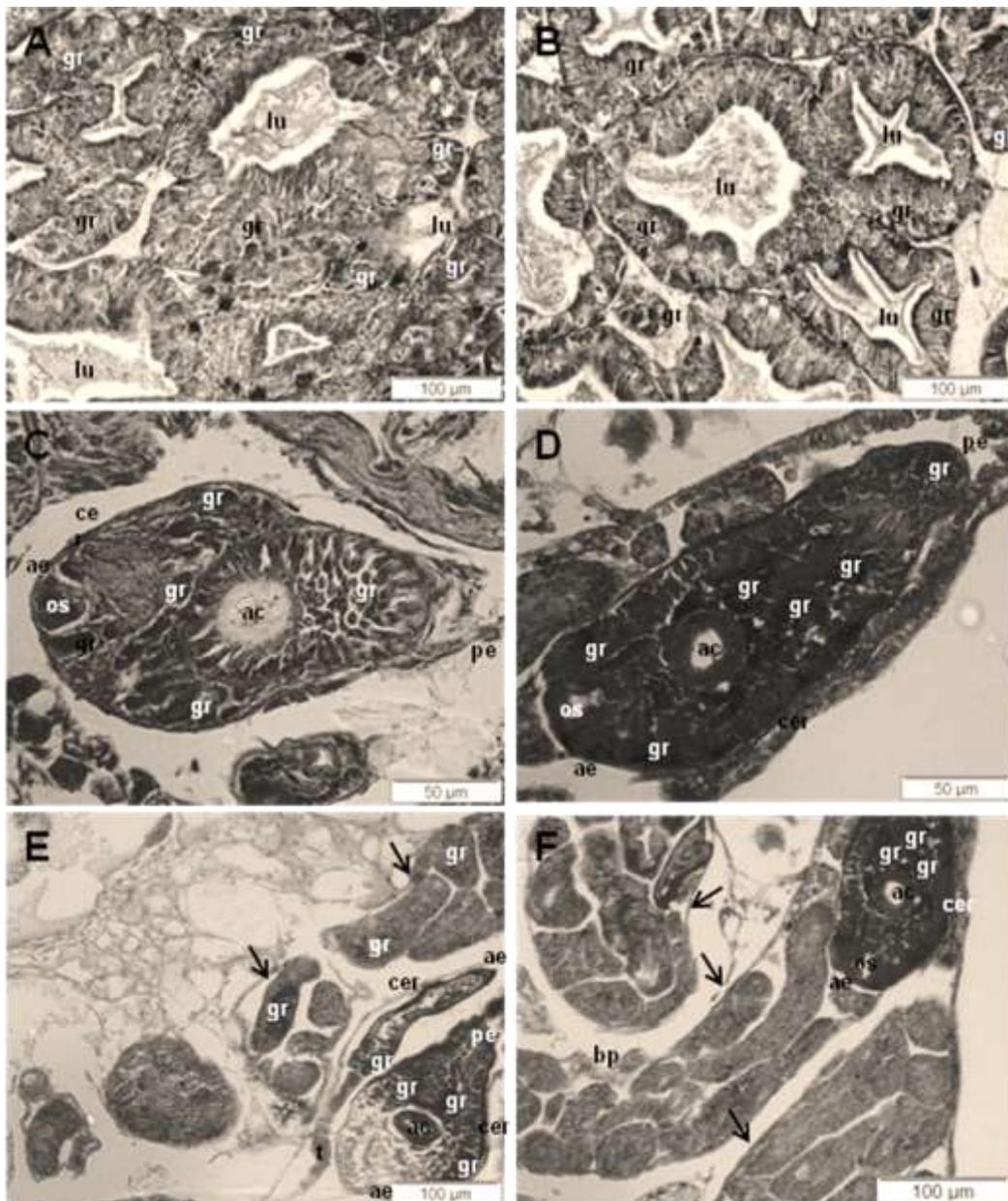
Em contraste, os níveis de ácido pirúvico nos grupos infectados foram menores e significativamente diferentes daquele apresentado pelo grupo controle ao longo de todo o experimento. Nos períodos mais tardios da infecção (terceira e quarta semanas), os conteúdos deste substrato não foram detectados em moluscos infectados, indicando que suas concentrações foram menores comparados àquelas utilizadas para a confecção da curva-padrão (Tabela 3). Da mesma maneira, os níveis de ácido succínico não foram detectados em ambos os grupos infectados, indicando decréscimo significativo em suas concentrações quando comparado aos moluscos não-infectados (Tabela 3).

**Tabela 3.** Níveis de ácidos orgânicos na hemolinfa (mM) de *Biomphalaria glabrata* infectada com 5 e 50 miracídeos de *Echinostoma paraensei*, em diferentes períodos de infecção, expressos em semanas. Semana 0 (zero) representa a média do grupo controle durante as quatro semanas de análises, uma vez que não houveram diferenças significativas nestas semanas. a, b, c, d = médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente,  $P < 0.05$ , (média  $\pm$  desvio-padrão). ND= ácidos orgânicos não detectados.

Semanas	Ácido oxálico (mM)		Ácido succínico (mM)		Ácido pirúvico (mM)		Ácido láctico (mM)	
	5	50	5	50	5	50	5	50
0	29,67 $\pm$ 0,77 <sup>a</sup>		40,18 $\pm$ 0,63		12403,60 $\pm$ 57,42 <sup>a</sup>		37,37 $\pm$ 4,38 <sup>a</sup>	
1	37,29 $\pm$ 0,23 <sup>a,b</sup>	34,73 $\pm$ 0,95 <sup>a</sup>	ND	ND	550,78 $\pm$ 47,30 <sup>b</sup>	431,7 $\pm$ 27,47 <sup>b</sup>	31,51 $\pm$ 0,72 <sup>a</sup>	37,54 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>
2	43,17 $\pm$ 7,94 <sup>b,c</sup>	85,59 $\pm$ 8,85 <sup>b</sup>	ND	ND	27,06 $\pm$ 2,38 <sup>c</sup>	13,67 $\pm$ 4,60 <sup>c</sup>	61,59 $\pm$ 2,10 <sup>b</sup>	75,71 $\pm$ 3,46 <sup>b</sup>
3	47,79 $\pm$ 0,15 <sup>c</sup>	89,77 $\pm$ 1,65 <sup>b</sup>	ND	ND	ND	ND	187,32 $\pm$ 0,38 <sup>c</sup>	224,24 $\pm$ 16,62 <sup>c</sup>
4	46,37 $\pm$ 0,70 <sup>b,c</sup>	80,41 $\pm$ 3,46 <sup>b</sup>	ND	ND	ND	ND	95,2 $\pm$ 1,25 <sup>d</sup>	119,92 $\pm$ 1,20 <sup>d</sup>

#### 4.3.4 Análises histoquímicas

Os resultados histoquímicos (PAS) revelaram a presença de estágios de cercárias na glândula digestiva de moluscos infectados por *E. paraensei*, e no seu interior a presença de grânulos de glicogênio. Em relação aos moluscos controle, a ausência de larvas do parasito foi demonstrada em secções da glândula digestiva, com sua integridade e funcionalidade preservadas (Figuras 5A, B, C, D, E e F).



**Figura 5.** Corte histológico da glândula digestiva de *Biomphalaria glabrata* corado por PAS. **A e B** - Secção de moluscos não infectados mostrando a integridade e funcionalidade da glândula digestiva, bem como a ausência de larvas do parasito, exibindo lúmen com a presença de material amorfo (lu) e grânulos de glicogênio (gr). **C, D, E e F**- Corte histológico da região da glândula digestiva de moluscos experimentalmente infectados por *Echinostoma paraensei* exibindo uma região caracterizada por intensa desorganização celular decorrida pela presença de rédias (↑) e cercárias (cer), ventosa oral (os), poro de nascimento (bp), acetábulo (ac), cauda (t), extremidade anterior (ae) e posterior (pe) e a presença de grânulos de glicogênio (gr).

#### 4.4 DISCUSSÃO

Vários estudos têm demonstrado alterações no metabolismo de moluscos infectados por larvas de trematódeos, que acabam obtendo da hemolinfa do hospedeiro nutrientes essenciais para o seu desenvolvimento, além também, de excretarem metabólitos oriundos do seu metabolismo. Assim, estes dois processos – remoção de nutrientes e liberação de produtos de excreção – alteram a composição normal da hemolinfa. Nestas circunstâncias, o molusco entra em balanço energético negativo mobilizando suas reservas de carboidratos, tais como glicogênio, principalmente da glândula digestiva e secundariamente da massa cefalopediosa, para assegurar sua sobrevivência (de SOUZA et al., 2000; PINHEIRO et al., 2009).

Thompson e Lee (1985) verificaram que *B. glabrata* submetidas a períodos de jejum, bem como infectadas por *S. mansoni* mantiveram os níveis de glicose constantes na hemolinfa. Isto indica a presença de mecanismos homeostáticos objetivados na manutenção da glicemia, seja a partir da mobilização de reservas (glicogênio) ou através da modulação de vias bioquímicas (BECKER, 1980; CREWS; YOSHINO, 1990). A concentração de glicogênio na glândula digestiva e massa cefalopediosa de *B. glabrata*, aqui analisada durante o desenvolvimento de *E. paraensei* em seu hospedeiro intermediário, foi significativamente menor em relação ao grupo não-infectado. Esta redução foi mais pronunciada na glândula digestiva, um órgão que estoca glicogênio para a manutenção geral do metabolismo do molusco. Portanto, este sítio foi selecionado durante a co-evolução parasito-hospedeiro para o desenvolvimento larval do trematódeo. Este fato é reforçado pelos resultados histoquímicos apresentados aqui, que demonstraram a presença de estágios de cercárias no interior de rédias e a capacidade destes estágios em sintetizar glicogênio, utilizando substratos absorvidos diretamente da hemolinfa que perfunde este órgão. A capacidade de incorporar monômeros de glicose a partir da hemolinfa do hospedeiro pelas larvas de trematódeos foi observada por

Pinheiro e Amato (1994). De acordo com estes autores, a presença de esporocistos de *Eurytrema coelomaticum* (Giard et Billet, 1892) Looss, 1907 na superfície externa da glândula digestiva de *Bradybaena similis* (Férussac, 1821) apresentariam a habilidade de remover monômeros de glicose necessários para a manutenção dos intensos processos metabólicos verificados durante a etapa de desenvolvimento ontogênico desta espécie de parasito.

Os resultados histológicos/histoquímicos do presente estudo também indicam um intenso processo de lesão e desorganização celular da glândula digestiva de *B. glabrata* infectada por *E. paraensei*. Estes achados sugerem a perda das funções fisiológicas deste sítio, caracterizada pela inabilidade de estocar glicose na forma de glicogênio, explicando em parte a quebra da normoglicemia nos períodos mais tardios da infecção por este equinostomatídeo. Este período (terceira e quarta semanas) coincide com a formação e maturação de rédias (PINHEIRO et al., 2005), um estágio caracterizado pela presença de boca primitiva, faringe muscular e intestino, possibilitando às larvas alimentarem-se diretamente de tecidos da glândula digestiva de *B. glabrata* (FRIED; HUFFMAN, 1996), culminando com lesões celulares mais severas. O mesmo tem sido observado por Moore e Halton (1973), que reportaram um aspecto degenerativo da glândula digestiva de *Lymnaea truncatula* (Muller, 1774) infectada por *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758), trematódeo que também apresenta estágios de rédias em seu ciclo de vida.

Em relação aos conteúdos de glicose, os resultados obtidos aqui revelam que inicialmente os níveis deste açúcar em moluscos infectados com 5 e 50 miracídios tenderam a oscilar dentro da normalidade, apresentando valores em média próximos ao do grupo controle, com significativo aumento de seus níveis somente a partir da terceira semana pós infecção. Tal variação pode ser parcialmente explicada através da aceleração da gliconeogênese (TUNHOLI et al., 2011c). Esta tendência tem também sido observada por Tunholi-Alves et al. (2011) estudando a relação *B. glabrata/E. paraensei*, no qual sugerem que o decréscimo nos conteúdos de triacilgliceróis na hemolinfa de moluscos infectados está relacionado com a manutenção da glicemia, uma vez que, o triacilglicerol é hidrolisado formando glicerol que então é fosforilado, dando origem ao glicerol-3-fosfato, que por sua vez pode ser direcionado à gliconeogênese. Assim, a variação nos níveis de glicose observada na hemolinfa de *B. glabrata* infectada por *E. paraensei* a partir da terceira semana de infecção provavelmente resulta da ativação do catabolismo protéico (TUNHOLI et al., 2011b) e

lipídico como mecanismos fisiológicos compensatórios, bem como da ativação da gliconeogênese e perda das funções da glândula digestiva do molusco.

Ativação do metabolismo anaeróbio nos moluscos infectados foi também observada, possivelmente como uma via alternativa de manutenção energética do hospedeiro e das larvas do parasito em desenvolvimento, sugerindo para este sistema de interação, uma resposta dose dependente, já que organismos submetidos a uma elevada carga parasitária (50 miracídios) apresentaram maior atividade da LDH. Resultados similares foram obtidos por el-Ansary *et al.*, (2000), que ao estudar a susceptibilidade de *Biomphalaria alexandrina* (Ehrenberg, 1831) a infecção por *S. mansoni*, relataram uma marcada estimulação de centros enzimáticos relacionados a via glicolítica, especialmente a lactato LDH, sendo essenciais para o sucesso da infecção. Ao nível molecular, *B. alexandrina* e *Bulinus truncatus* (Audouin, 1827) infectados com *S. mansoni* apresentaram uma reduzida capacidade para realizar as oxidações do ciclo do ácido tricarboxílico, baixa atividade da citocromo oxidase, reduzida capacidade de realizar a gliconeogênese e elevada produção de lactato (ISHAK *et al.*, 1975). Isto indica uma redução no metabolismo aeróbio e aceleração da degradação anaeróbia de carboidratos em moluscos infectados, através de fermentação láctica (MOHAMED; ISHAK, 1982).

Na ordem de melhor entender o efeito da infecção no metabolismo oxidativo de carboidratos de *B. glabrata*, mensuramos as concentrações de certos ácidos orgânicos, tais como o ácido oxálico, succínico, pirúvico e láctico, presentes na hemolinfa do hospedeiro. A diminuição nos níveis de ácido pirúvico e o aumento nos conteúdos de ácido láctico observado em moluscos infectados quando comparado aos organismos não-infectados confirma a ativação de um metabolismo anaeróbio via LDH. O estabelecimento desta condição metabólica sugere a habilidade de *B. glabrata* em aumentar a atividade de vias metabólicas alternativas para obtenção de energia, sugerindo o acionamento de uma resposta adaptativa do molusco frente à infecção, possibilitando sintetizar ATP a partir da redução do piruvato e re-oxidação do NADH. Interessantemente, as maiores concentrações de ácido láctico ocorreram nos períodos mais tardios da infecção (terceira e quarta semanas) em ambos os grupos infectados (5 e 50 miracídios), confirmando que este é o período de maior demanda energética pelo hospedeiro e pelas larvas em desenvolvimento do parasito. Alterações similares foram verificadas por Bezerra *et al.* (1999) avaliando o efeito da estivação em *B. glabrata*. Em adição, o aumento nos conteúdos de ácido láctico nos organismos infectados (5 e 50 miracídios) pode também ser devido a ativação do catabolismo protéico culminando com o

aumento nos níveis de aminoácidos gliconeogênicos e finalmente no acúmulo deste ácido (HOCHACHKA, 1983).

O acúmulo de ácido oxálico em ambos os grupos infectados sugerem a desaceleração do ciclo de Krebs, e, portanto, a transição do metabolismo aeróbio para o anaeróbio em *B. glabrata*. Este aumento foi maior nos moluscos expostos a 50 miracídios, demonstrando que neste modelo, a concentração de ácido oxálico é dose-dependente. Esta dependência tem sido frequentemente observada em moluscos infectados (BEZERRA et al., 1997), indicando que o estabelecimento de *E. paraensei* em *B. glabrata* requer a aceleração do metabolismo anaeróbio do hospedeiro. Em paralelo, o ácido succínico não foi detectado em ambos os grupos infectados, apresentando valores menores aqueles utilizados para a preparação da curva padrão. Assim, as menores concentrações deste ácido nos organismos infectados podem ser parcialmente explicadas através da redução do malato a succinato via fumarato redutase em direção oposta ao ciclo do ácido tricarboxílico (TIELENS, 1994). Como consequência a desmutação do malato, succinato é metabolizado a propionato, resultando na produção de energia e manutenção do balanço redox (TIELENS, 1994).

Finalmente, os resultados reportados aqui sugerem que a infecção por 50 miracídios de *E. paraensei* causou mais severas alterações, caracterizadas pela maior atividade da LDH e menores concentrações de glicogênio quando comparado aos moluscos infectados com cinco miracídios, indicando uma resposta dose-dependente. Adicionalmente, os resultados da CLAE confirmaram a aceleração na taxa do metabolismo anaeróbio em *B. glabrata* infectada por este equinostomatídeo, já que o aumento da atividade da LDH foi acompanhado pela redução nos conteúdos do ácido pirúvico e aumento nos níveis de ácido láctico na hemolinfa de moluscos infectados. Em paralelo, as técnicas histológicas e histoquímicas demonstraram alterações físicas causadas pelas larvas do trematódeo em desenvolvimento, refletindo em alterações nos estoques de glicogênio, conduzindo o hospedeiro a um remodelamento metabólico, capaz de suprir a alta demanda energética necessária para a manutenção do metabolismo do hospedeiro e do desenvolvimento ontogênico do parasito. Este cenário representa uma resposta fisiológica interessante do hospedeiro contra a infecção, necessária para garantir sua sobrevivência, bem como o completo desenvolvimento do parasito. Esta informação pode ser utilizada no desenvolvimento de medidas de controle do molusco hospedeiro, evitando assim que este acione vias metabólicas relacionadas com a sua sobrevivência.

#### 4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BANDSTRA, S.R.; FRIED, B.; SHERMA, J. High-performance thin-layer chromatographic analysis of neutral lipids and phospholipids in *Biomphalaria glabrata* patently infected with *Echinostoma caproni*. **Parasitology Research**, v.99, p.414 – 418, 2006.

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

BEZERRA, J.C.B.; BECKER, W.; ZELCK, U.E. A comparative study of the organic acid content of the hemolymph of *Schistosoma mansoni*-resistant and susceptible strains of *Biomphalaria glabrata*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.92, p.421– 425, 1997.

BEZERRA, J.C.B.; KEMPER, A.; BECKER, W. Profile of organic acid concentrations in the digestive gland and hemolymph of *Biomphalaria glabrata* under estivation. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.94, p.779–784, 1999.

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

de SOUZA, R.M.; GOMES, E.M.; CHAGAS, G.M.; PINHEIRO, J. The Influence of starvation and *Eurytrema coelomaticum* infection on the nitrogenous products of degradation in the hemolymph of *Bradybaena similaris*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.43, p.365–371, 2000.

EL-ANSARY, A.; SAMMOUR, E.M.; MOHAMED, A.M. Susceptibility of *Biomphalaria alexandrina* to infection with *Schistosoma mansoni*: correlation with the activity levels of certain glycolytic enzymes. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v.30, p.547– 560, 2000.

FERNANDES, M.C. Métodos Escolhidos de Técnicas Microscópicas, second ed. 492 Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, RJ, 1949.

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

HOCHACHKA, P.V. In: Wilbur, K.M. (Ed.). The mollusca, vol. 1. Academic Press, New York, p. 510, 1983.

HUMASON, G.L. Animal Tissue Techniques, 4th ed. W.H. Freeman, San Francisco, USA, 1979.

ISHAK, M.M.; MOHAMED, A.M.; SHRAF, A.A. Carbohydrate metabolism in uninfected and trematode-infected snails *Biomphalaria alexandrina* and *Bulinus truncatus*. **Comparative Biochemistry Physiology (B)**, v.53, p.499–505, 1975.

LIE, K.J.; BASCH, P.F. The Life History of *Echinostoma paraensei* sp. (Trematoda: Echinostomatidae). **The Journal of Parasitology**, v.53, p.1192–1199, 1967.

LOKER, E.S.; HERTEL, L.A. Alterations in *Biomphalaria galabrata* plasma induced by infection with the digenetic trematode *Echinostoma paraensei*. **The Journal of Parasitology**, v.73, p.503–513, 1987.

MALDONADO JR., A.; COURA, R.; GARCIA, J.S.; LANFREDI, R.M.; REY, L. Changes on *Schistosoma mansoni* (Digenea: Schistosomatidae) worm load in *Nectomys squamipes* (Rodentia: Sigmodontinae) concurrently infected with *Echinostoma paraensei* (Digenea: Echinostomatidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.96, p.193–198, 2001.

MASSA, D.R.; CHEJLAVA, M.J.; FRIED, B.; SHERMA, J. High performance column liquid chromatographic analysis of selected carboxylic acids in *Biomphalaria glabrata* patently infected with *Schistosoma mansoni*. **Parasitology Research**, v.101, p.925–928, 2007.

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. *hislopii* látex. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.105, p.492–495, 2010.

MOHAMED, A.M.; ISHAK, M.M. Comparative effects of schistosome infection and starvation on the respiratory transport chain of the snails *Biomphalaria alexandrina* and *Bulinus truncatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.71B, p.289–292, 1982.

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

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

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

PINHEIRO, J.; MALDONADO JR., A.; ATTIAS, M.; LANFREDI, R.M. Morphology of the rediae of *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae) from its intermediate host *Lymnaea columella* (Mollusca, Gastropoda). **Parasitology Research**, v.93, p.171–177, 2004a.

PINHEIRO, J.; MALDONADO JR., A.; ATTIAS, M.; LANFREDI, R.M. Ultrastructure of the Miracidium of *Echinostoma paraensei* Lie and Basch, 1967 (Trematoda, Echinostomatidae). **Parasitology Research**, v.97, p.367–372, 2005.

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, 2004b.

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

SLUITERS, J.F.; BRUSSAARD-WUST, C.C.M.; MEULEMAN, E.A. The relationship between miracidial dose, production of cercariae, and reproductive activity of the host in the combination *Trichobilharzia ocellata* and *Lymnaea stagnalis*. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v.63, p.13–26, 1980.

SUMNER, J.B. The estimation of sugar in diabetic urine using dinitrosalicylic acid. **Journal of Biology Chemistry**, v.62, p.287–290, 1924.

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

TIELENS, A.G.M. Energy generation in parasitic helminths. **Parasitology Today**, v.10, p.346–352, 1994.

TUNHOLI-ALVES, V.M.; TUNHOLI, V.M.; GÔLO, P.; LUSTRINO, D.; MALDONADO JR., A.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; RODRIGUES, M.L.A.; PINHEIRO, J. Lipid levels in *Biomphalaria glabrata* infected with different doses of *Echinostoma paraensei* miracidia. **Experimental Parasitology**, v.128, p.212–216, 2011.

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

TUNHOLI, V.M.; LUSTRINO, D.; TUNHOLI-ALVES, V.M.; MELLO-SILVA, C.C.C.; MALDONADO JR., A.; PINHEIRO, J.; RODRIGUES, M.L.A. Biochemical profile of

*Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Gastropoda) after infection by *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae). **Parasitology Research**, v.109, p.855–891, 2011b.

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, 2011c.

VASQUEZ, R.E.; SULLIVAN, J.T. Effect of miracidial dose on adoptively transferred resistance to *Schistosoma mansoni* in the snail intermediate host, *Biomphalaria glabrata*. **The Journal of Parasitology**, v.87, p.460–462. 2001.

WHITE, M.M.; CHEJLAVA, M.; FRIED, B.; SHERMA, J. Effects of various larval digeneans on the calcium carbonate content of the shells of *Helisoma trivolvis*, *Biomphalaria glabrata*, and *Physa* sp. **Parasitology Research**, v.95, p.252–255, 2005.

## 5 CAPÍTULO II

**FISIOLOGIA MITOCONDRIAL DE *Biomphalaria glabrata* (MOLLUSCA,  
GASTROPODA) APÓS INFECÇÃO POR *Echinostoma paraensei* (TREMATODA,  
ECHINOSTOMATIDAE).**

FISIOLOGIA MITOCONDRIAL DE *Biomphalaria glabrata* (MOLLUSCA,  
GASTROPODA) APÓS INFECÇÃO POR *Echinostoma paraensei* (TREMATODA,  
ECHINOSTOMATIDAE).

**RESUMO**

O efeito da infecção por *Echinostoma paraensei* sobre a fisiologia mitocondrial de *Biomphalaria glabrata* foi investigada após exposição a 50 miracídios. Os moluscos foram dissecados uma, duas, três e quatro semanas pós-infecção para a coleta e permeabilização mecânica do complexo gônada-glândula digestiva (DGG). Os resultados obtidos pelo presente estudo indicam que a infecção pré-patente por este equinostomatídeo suprime

significativamente o estado fosforilativo (estado 3 respiratório) e o consumo basal de oxigênio em *B. glabrata*, demonstrando que a infecção diminui a capacidade do hospedeiro intermediário em realizar reações oxidativas aeróbias. Em adição, variações relevantes relacionadas ao estado mitocondrial desacoplado (estado 3u) de *B. glabrata* infectada por *E. paraensei* foram também observadas. Após a quarta semana de análises, uma significativa redução no consumo de oxigênio mitocondrial após adição de ADP ( $3,68 \pm 0,26$ ) foi verificada em *B. glabrata* infectadas quando comparado a média de seu respectivo grupo controle ( $5,14 \pm 0,25$ ). Quando se avaliou o estado desacoplado, moluscos infectados consumiram cerca de 62% a menos de oxigênio em relação aqueles não infectados ( $7,87 \pm 0,84$ ) no mesmo período. Tais resultados sugerem uma redução na taxa de descarboxilação oxidativa das reações que integram o ciclo do ácido tricarboxílico e aceleração da degradação anaeróbia de carboidratos nos moluscos infectados. Os possíveis mecanismos que justificam esta nova condição metabólica nos organismos infectados são discutidos.

**Palavras-chaves:** Relação parasito-hospedeiro; metabolismo mitocondrial; *Biomphalaria glabrata*; *Echinostoma paraensei*.

## ABSTRACT

The effect of infection by *Echinostoma paraensei* on mitochondrial physiology of *Biomphalaria glabrata* was investigated at different times after exposure to 50 miracidia. Snails were dissected one, two, three and four weeks post-infection for the collection and permeability of the digestive gland-gonad complex (DGG). The results obtained in this study indicate that during the pre-patent period of the infection, the phosphorylation state (state 3 respiration) and the basal oxygen consumption (states 1 and 2) of *B. glabrata* were significantly suppressed, indicating that the infection decreases the capacity of the intermediate host in performing aerobic oxidative reactions. In addition, significant changes

related to mitochondrial uncoupled state (3u) of *B. glabrata* infected with *E. paraensei* were also observed. After the fourth week of exposure, *B. glabrata* showed a significant reduction in oxygen consumption after addition of ADP ( $3.68 \pm 0.26$ ) compared to average their respective control group ( $5.14 \pm 0, 25$ ). But the unbound state, resulted in decrease of about 62% in the consumption of oxygen in the infected group when compared to uninfected organisms ( $7.87 \pm 0.84$ ). These results demonstrate reduction in oxidative decarboxylation rate of reactions that are part of the tricarboxylic acid cycle and acceleration of anaerobic degradation of carbohydrates in infected snails. Possible mechanisms that justify this new metabolic condition in infected organisms are discussed.

**Keywords:** Host-parasite relationship; mitochondrial metabolism; *Biomphalaria glabrata*; *Echinostoma paraensei*.

## 5.1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a relação parasito-hospedeiro representa um vasto campo de pesquisa. Vários estudos têm verificado a influência da infecção por larvas de trematódeos e nematóides sobre o metabolismo de carboidratos (PINHEIRO et al., 2009), de proteínas (TUNHOLI-ALVES et al., 2012; TUNHOLI et al., 2014) e de lipídios (TUNHOLI-ALVES et al., 2011; ALVES et al., 2014) em seus respectivos hospedeiros intermediários. Segundo estes autores, quando submetidos a condições de estresse fisiológico, tais como o parasitismo, moluscos hospedeiros apresentariam a capacidade de acionarem importantes vias metabólicas imprescindíveis na manutenção de suas reações vitais, garantindo assim a sua sobrevivência, bem como o completo desenvolvimento parasitário.

Em condições fisiológicas regulares, moluscos gastrópodes utilizam predominantemente o metabolismo aeróbio para obtenção de energia. Entretanto, Tunholi-Alves et al. (2014) estudando a interface *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818)/*Angiostrongylus cantonensis* Chen, 1933 têm demonstrado aceleração de reações das vias anaeróbias em moluscos infectados. Neste estudo, os autores verificaram que o aumento da atividade da lactato desidrogenase (EC 1.1.1.27 e EC 1.1.1.28) ocorreu em paralelo à redução dos níveis hemolinfáticos de ácido pirúvico e aumento das concentrações de ácido láctico na hemolinfa de moluscos infectados quando comparado aqueles não infectados. Tais resultados evidenciam a transição do metabolismo aeróbio para o anaeróbio do hospedeiro, possibilitando-o obter energia (ATP) a partir da redução do ácido pirúvico, além de assegurar a reoxidação do NADH (TUNHOLI et al., 2013). Esta condição metabólica representa uma interessante capacidade adaptativa do hospedeiro com relação ao parasitismo, assegurando assim sua capacidade em utilizar glicose como principal substrato energético.

Helmintos do gênero *Echinostoma* apresentam ampla distribuição geográfica e possuem a capacidade de infectar uma grande variedade de hospedeiros vertebrados e invertebrados. *Echinostoma paraensei* (Lie and Basch, 1967) é uma espécie de equinostomatídeo brasileiro que possui um ciclo obrigatoriamente heteroxeno (MALDONADO et al., 2001). Durante o seu desenvolvimento ontogênico larvas deste trematódeo evoluem até a fase de cercárias em moluscos aquáticos de onde emergem para penetrarem no segundo hospedeiro intermediário e se desenvolverem até o estágio de metacercárias, a qual, passivamente, infectará o hospedeiro vertebrado (MALDONADO et al., 2001).

*Biomphalaria glabrata* é reconhecido por hospedar *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 podendo também participar do ciclo de vida de *E. paraensei*, agente etiológico capaz de infectar o homem e animais silvestres (CHAI et al., 2005). Alterações no metabolismo oxidativo de *B. glabrata* infectada por diferentes cargas miracidiais de *E. paraensei* tem sido demonstradas (TUNHOLI et al., 2013). Segundo os autores, a infecção induziu a ativação de vias anaeróbias dependentes de lactato desidrogenase, possibilitando a manutenção do balanço redox e produção de energia pelo molusco hospedeiro. Embora estudos prévios tenham evidenciado o aumento da atividade de vias fermentativas envolvidas na obtenção de energia em moluscos infectados, aspectos bioquímicos relacionados com a fisiologia mitocondrial nestes organismos, ainda não foram totalmente esclarecidos, limitando o conhecimento acerca da relação parasito-hospedeiro.

O objetivo do presente estudo foi analisar pela primeira vez os efeitos da infecção experimental de *B. glabrata* por *E. paraensei* sobre a atividade mitocondrial do molusco hospedeiro durante quatro semanas de infecção, período que corresponde etapa de desenvolvimento pré-patente deste parasito (Lie & Basch, 1967). Para isto, as atividades enzimáticas dos complexos protéicos que integram a cadeia respiratória mitocondrial de *B. glabrata* situados no complexo gônada-glândula digestiva do molusco hospedeiro foram avaliadas. Para Tunholi et al. (2011b), o complexo gônada-glândula digestiva configura-se como o principal sítio metabólico do hospedeiro intermediário, bem como de desenvolvimento parasitário sendo por isso utilizado neste estudo.

## 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.2.1 Coleta de ovos de *Echinostoma paraensei* e obtenção dos miracídios

O isolado de *E. paraensei* utilizado foi obtido de espécimes de *Nectomys squamipes* que foram naturalmente infectados e capturados no município de Sumidouro, Estado do Rio de Janeiro, Brasil em 2001 (22°02'46" S, 42°41'21" W). O ciclo de vida tem sido mantido no Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestre Reservatórios - LABPMR (IOC) FIOCRUZ – Rio de Janeiro (Brasil), através de passagens usando hamsters *Mesocricetus auratus* (Waterhouse, 1839) como hospedeiro definitivo e *Biomphalaria glabrata* como primeiro e segundo hospedeiros intermediários.

Hamsters adultos experimentalmente infectados com *E. paraensei* foram eutanaziados em câmara de CO<sub>2</sub>, de acordo com o protocolo aprovado pelo Comitê de Ética de Uso Animal (CEUA L-074/08). Os helmintos adultos foram coletados do intestino delgado do hospedeiro definitivo e transferidos para placas de Petri contendo solução de NaCl a 0,9%. Os úteros dos helmintos foram dissecados para a obtenção dos ovos, nos quais foram lavados e incubados em água destilada a 26°C durante 14 dias. Após este período, os ovos embrionados foram expostos a luz artificial para estimular a eclosão miracidial (PINHEIRO et al., 2004a,b, 2005).

### 5.2.2 Manutenção dos moluscos e formação dos grupos

Em cada aquário foram previamente colocados 1500ml de água destilada onde era acrescentado cerca de 0,5g de CaCO<sub>3</sub>. Uma vez por semana a água era renovada. Foram formados 08 grupos, quatro grupos controle (não infectados) utilizando n=20 moluscos e 4 grupos de moluscos infectados com 50 miracídios cada (n=20 moluscos). Cada aquário era composto por 05 moluscos sendo todo experimento realizado em duplicata, utilizando um “n”

total de 80 moluscos. A dose miracidial de 50 miracídeos/molusco foi preconizada neste estudo, uma vez que autores têm verificado que as alterações fisiológicas de *B. glabrata* infectada por *E. paraensei* são dose dependente, sendo estas mais expressivas nos organismos com alta parasitemia (TUNHOLI et al., 2011a,b).

A alimentação dos moluscos foi feita com folhas de alface frescas (*Lactuca sativa* Linnaeus, 1753) *ad libitum*. A manutenção do aquário foi realizada em dias alternados, quando as folhas de alface eram renovadas, evitando sua fermentação no interior dos aquários. O número de moluscos mortos também foi um critério observado e contabilizado.

### **5.2.3 Obtenção de *Biomphalaria glabrata* e infecção experimental**

Os moluscos foram obtidos da colônia de manutenção do Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, Fundação Instituto Oswaldo Cruz, RJ, Brasil.

Após a obtenção dos moluscos (8 -12 mm) estes foram colocados numa placa de 24 furos contendo água destilada, onde os miracídeos foram colocados previamente com o auxílio de uma micropipeta, proporcionando uma infecção individual de cinquenta (50) miracídeos por molusco (SLUITERS et al., 1980; VASQUEZ; SULLIVAN, 2001). Vinte e quatro horas após a exposição, os moluscos foram retirados da placa e transferidos para aquários.

Em seguida, os caramujos foram então removidos das placas e transferidos para os aquários. Somente aqueles moluscos que albergavam esporocistos de *E. paraensei* em seus respectivos sistemas circulatórios foram selecionados para estudos adicionais, uma vez que esporocistos já são visíveis em 2 dias pós-infecção (LOKER; HERTEL, 1987).

### **5.2.4 Dissecção dos moluscos para coleta dos tecidos**

Semanalmente moluscos de cada grupo experimental (n = 5) foram dissecados sem anestesia e o complexo gônada-glândula digestiva (DGG) separado para análises. A permeabilização tecidual do DGG foi realizada de acordo com Kuznetsov et al. (2002). Rapidamente, os tecidos (DGG) de *B. glabrata* (infectadas e não-infectadas) foram manipulados mecanicamente e individualmente, com auxílio de pinças e tesoura, em placa de Petri na presença de 100µl de meio de respiração (RM-A) contendo 60 mmol<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 7.4, 110 mmol l<sup>-1</sup> mannitol, 60 mmol l<sup>-1</sup> KCl, 5 mmol l<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mmol l<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mmol l<sup>-1</sup> EDTA, 0.2 mg ml<sup>-1</sup> BSA essencialmente ácidos graxos livres (BSA<sub>FFA</sub>), permitindo maior acessibilidade dos substratos às mitocôndrias intactas.

### **5.2.5 Consumo de oxigênio no DGG permeabilizado utilizando high-resolution respirometry**

Consumo de oxigênio foi mensurado em titration-injection high-resolution respirometers (Oroboros, Oxygraph; Innsbruck, Austria) (GNAIGER, 2001). Os tecidos foram incubados em solução de 2,0 ml de RM-B, e a cubeta foi fechada imediatamente antes do início dos experimentos. A respiração basal (estado 2) foi avaliada após a adição dos substratos mitocondriais (5 mmol l<sup>-1</sup> de piruvato; 5 mmol l<sup>-1</sup> de malato para o complexo I e 10 mmol l<sup>-1</sup> de succinato plus 1 mmol l<sup>-1</sup> rotenona para o complexo II). A taxa de respiração fosforilativa (estado 3) foi mensurada com a adição de 0,5 mmol l<sup>-1</sup> ADP; estado 4 (perda de prótons) e estado 3u (estado desacoplado) foram obtidos com a adição de 1 mg ml<sup>-1</sup> de oligomicina e 0,4 mmol l<sup>-1</sup> FCCP, respectivamente.

### **5.2.6 Análises estatísticas**

Os resultados obtidos foram expressos como média ± desvio padrão e o teste de Tukey ANOVA foi utilizado para a comparação das médias ( $\alpha=5\%$ ) (InStat, GraphPad, v.4.00, Prism, GraphPad, v.3.02, Prism Inc.).

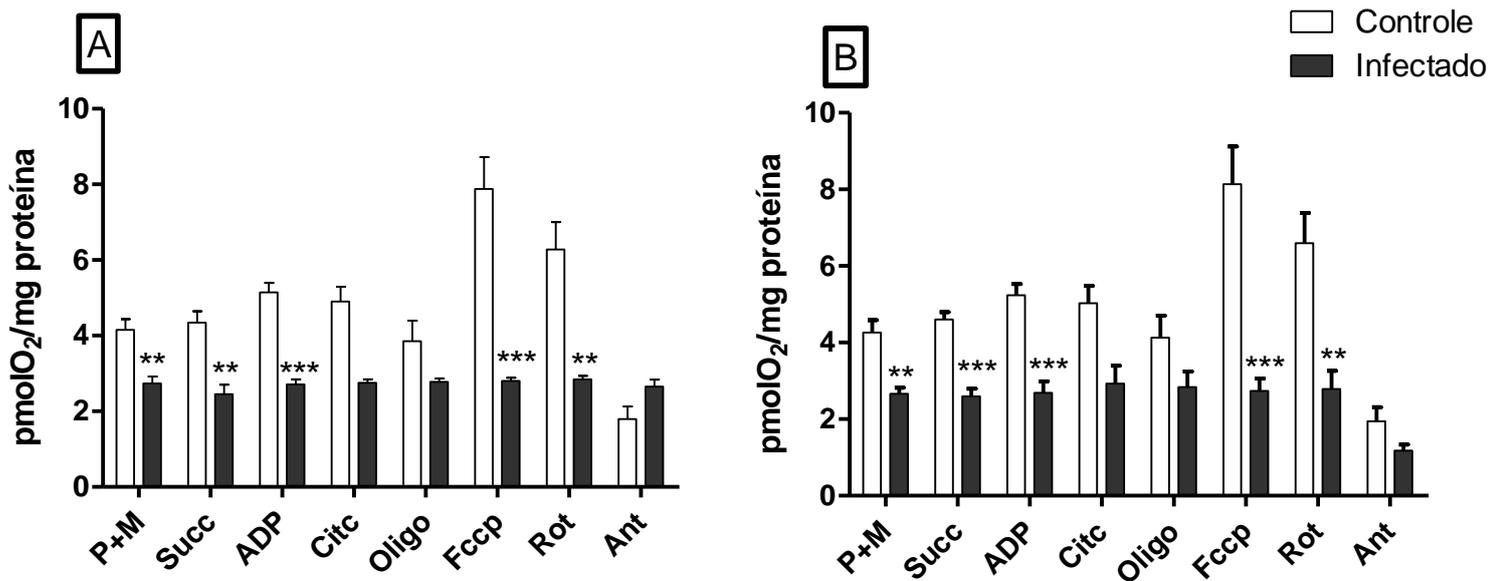
## **5.3 RESULTADOS**

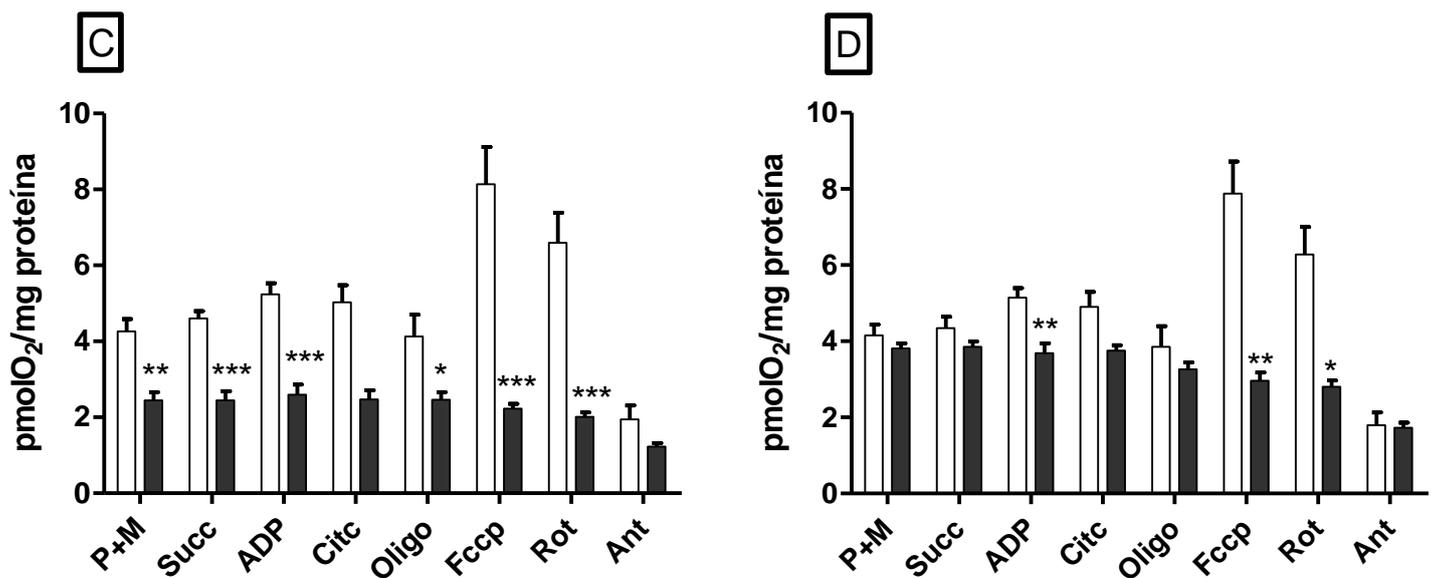
A infecção por *E. paraensei* induziu a inibição da atividade enzimática dos complexos protéicos que integram a cadeia respiratória de *B. glabrata*. Após a primeira semana de infecção, decréscimo de 34,21%, 43,54% e 47,27% no consumo de oxigênio após a adição de (piruvato + malato), succinato e ADP, respectivamente, foi verificado nos moluscos infectados quando comparado ao grupo controle (Figura 1A), demonstrando que a infecção por este equinostomatídeo diminui a capacidade do hospedeiro intermediário em realizar reações oxidativas. Quando o estado 3u (estado desacoplado) foi avaliado através da adição de FCCP, agente desacoplador, no meio respiratório, moluscos não infectados consumiram cerca de 64% (7,87±0,84) a mais de oxigênio em relação aqueles infectados (2,8±0,08) (Figura 1A). O mesmo padrão de variação foi verificado quando se adicionou no meio rotenona, agente inibidor do complexo I- NADH Q-oxidoreductase (Figura 1A).

A mesma tendência de variação foi demonstrada para moluscos infectados após a segunda e terceira semanas (Figuras 1B e 1C). Os resultados apresentados indicam uma

supressão no metabolismo oxidativo mitocondrial do hospedeiro com comprometimento nos diferentes estados respiratórios.

Similarmente, expressivas alterações na fisiologia mitocondrial de *B. glabrata* infectada por *E. paraensei* foram também observadas após a quarta semana de análises (Figura 1D). A caracterização do estado fosforilativo (estado 3 mitocondrial) de *B. glabrata* revelou uma significativa redução no consumo de oxigênio após adição de ADP entre moluscos infectados ( $3,68 \pm 0,26$ ) quando comparado a média de seu respectivo grupo controle ( $5,14 \pm 0,25$ ). Já o estado desacoplado, resultou no decréscimo de cerca de 62% no consumo de oxigênio no grupo infectado quando comparado aos organismos não infectados ( $7,87 \pm 0,84$ ) (Figura 1D).





**Figura 1.** Relação estabelecida entre o consumo de oxigênio mitocondrial de *B. glabrata*, expressado por pmol O<sub>2</sub>/mg proteína e adições seqüenciais de Malato (M) (5 mM), Piruvato (P) (5 mM), ADP (0,5 mM), Oligomicina (Oligo) (1ug/ml), FCCP (0,4 uM), Rotenona (Rot) (1 uM) e Antimicina A (Ant) (5 uM), após primeira (A), segunda (B), terceira (C) e quarta (D) semana de infecção por 50 miracídeos de *Echinostoma paraensei*. \* = Médias diferem significativamente entre si (média±EP). Grupo controle (N=5 moluscos); grupo infectado (N=5 moluscos).

## 5.4 DISCUSSÃO

A infecção por larvas de trematódeos altera as características bioquímicas da hemolinfa do hospedeiro (BANDSTRA et al., 2006; TUNHOLI et al., 2011b). Tal condição é estabelecida mediante a remoção de nutrientes diretamente da hemolinfa do molusco pelo parasito em desenvolvimento, bem como pela excreção/secreção de produtos oriundos do metabolismo parasitário. Segundo autores, quando infectados, moluscos hospedeiros apresentam balanço energético negativo, estado metabólico caracterizado pela redução na concentração de monômeros de glicose hemolinfática, além do consumo de glicogênio da glândula digestiva e massa cefalopédica, e de depósitos de galactogênio da glândula de albúmen do hospedeiro (PINHEIRO; AMATO, 1994; TUNHOLI-ALVES et al., 2011b). Nestas circunstâncias de estresse, verifica-se não somente ajustes comportamentais e fisiológicos, mas também adaptações bioquímicas do hospedeiro representadas pela utilização

de substratos não-glicídicos, como proteínas e lipídios, necessários a sua sobrevivência e imprescindíveis ao desenvolvimento parasitário (TUNHOLI-ALVES et al., 2012; TUNHOLI-ALVES et al., 2013).

A utilização de vias anaeróbias por gastrópodes é mínima em condições fisiológicas, apresentando estes fundamentalmente metabolismo oxidativo baseado em reações aeróbias para a obtenção de energia (STOREY, 1993). No entanto, a sobreposição de centros enzimáticos relacionados a vias anaeróbias fermentativas, como a lactato desidrogenase (LDH), em moluscos infectados por larvas de trematódeos (MANTAWY et al., 2013) e nematóides (STWART et al., 1985) tem sido observada. Em estudo recente, Tunholi et al. (2013) observaram aumento da atividade da LDH na hemolinfa de *B. glabrata* infectada por *E. paraensei*. Em adição, aumento nos níveis de ácido oxálico e láctico, bem como declínio nas concentrações de ácido pirúvico e succínico em moluscos infectados foram também demonstradas. Apesar deste estudo, o estado mitocondrial de *B. glabrata* infectada por *E. paraensei* ainda não tinha sido determinado.

Os resultados obtidos no presente estudo indicam que a infecção pré-patente de *E. paraensei* suprime significativamente o estado fosforilativo (estado 3 respiratório) e o consumo basal de oxigênio (estado 1 e 2) em *B. glabrata*, demonstrando que a infecção pelo equinostomatídeo diminui a capacidade do hospedeiro intermediário em realizar reações oxidativas aeróbias. Mohamed e Ishak (1982) avaliando o efeito da infecção de *S. mansoni* observaram, a partir de estudos moleculares, baixa atividade da citocromo oxidase, reduzida capacidade de realização da gliconeogênese e elevada produção de lactato em *B. alexandrina*. Tais resultados demonstram redução na taxa de descarboxilação oxidativa das reações que integram o ciclo do ácido tricarbóxico e aceleração da degradação anaeróbia de carboidratos nos moluscos infectados. De acordo com os autores, a redução na taxa de consumo de oxigênio mitocondrial do hospedeiro pode ser em parte explicada pela ação dos produtos de excreção/secreção das larvas do parasito em desenvolvimento, que atuam ou inibindo centros enzimáticos relacionados ao ciclo de Krebs, resultando no acúmulo de oxaloacetato, ou suprimindo complexos de oxidoredução que integram a via de fosforilação mitocondrial do molusco hospedeiro, passando a acionar mecanismos complementares para obtenção de energia (MANTAWY et al., 2013). Assim, condição similar poderia estar ocorrendo na interface *B. glabrata/E. paraensei*.

Variações relevantes relacionadas ao estado mitocondrial desacoplado (estado 3u) de *B. glabrata* infectada por *E. paraensei* foram também observadas após a adição da FCCP

(carbonil cianeto de p-trifluormetoxifenilhidrazona). Nestas condições, a diminuição na taxa de respiração mitocondrial em moluscos infectados, possivelmente resulta na redução do número de mitocôndrias situadas no complexo gônada-glândula digestiva nestes hospedeiros (STUART et al., 1998). Durante o desenvolvimento ontogênico de *E. paraensei* verifica-se intenso processo de reprodução assexuada, culminando com a formação de esporocistos, que por sua vez formarão numerosas rédias, que em seguida darão origem às também numerosas cercárias (PINHEIRO et al., 2004a,b, 2005). Como consequência, acentuada reação inflamatória é observada no complexo gônada-glândula digestiva do molusco hospedeiro, resultando em severas lesões celulares acompanhadas por proliferação focal e difusa de hemócitos, expansão da matriz extracelular, levando a formação de áreas de fibrose e calcificação metastática (BORGES et al., 1998; TUNHOLI-ALVES et al., 2013; TUNHOLI et al., 2013). Tais reações resultam no comprometimento funcional do órgão e podem contribuir para a redução da densidade mitocondrial na glândula digestiva de *B. glabrata* infectada, favorecendo a diminuição no consumo de oxigênio nestes organismos.

Hoch (1992) e Robinson (1993) verificaram que as atividades de muitas proteínas associadas à membrana mitocondrial são moduladas em função do meio fosfolipídico correspondente. Dentre os fosfolipídios, a cardiolipina, em particular, é encontrada em estreita associação com várias proteínas de membrana mitocondrial, regulando diretamente a atividade de algumas delas, como por exemplo, a citocromo-c oxidase, carnitina acil-transferase e ATPase (HOCH, 1992). Em estudo retrospectivo, Tunholi-Alves et al. (2011b) observaram variações no perfil lipídico de *B. glabrata* experimentalmente infectada por *E. paraensei*. Como principais resultados, um decréscimo significativo nos conteúdos de determinadas frações de lipídios neutros foi apresentada, indicando alterações estruturais importantes na glândula digestiva do hospedeiro. Assim, a depressão do sistema mitocondrial verificada em moluscos infectados pode ainda ser justificada em decorrência das alterações na composição de fosfolipídios que integram a membrana plasmática desta organela, contribuindo para a supressão de centros enzimáticos que compõem a cadeia respiratória.

Os resultados obtidos neste estudo indicam que a infecção por *E. paraensei* causa consideráveis variações na fisiologia mitocondrial de *B. glabrata*, induzindo a ativação de mecanismos fisiológicos compensatórios que garantem a sobrevivência do molusco hospedeiro e o completo desenvolvimento do parasito. A diminuição no consumo basal de oxigênio mitocondrial e, por conseguinte, a redução na taxa de fosforilação oxidativa em moluscos infectados demonstra a ativação de vias anaeróbias fermentativas complementares

como interessante estratégia metabólica desenvolvida pelo hospedeiro. Esta condição fisiológica observada nos organismos infectados é estabelecida possivelmente mediante a diminuição na densidade mitocondrial do tecido analisado, ou ainda, em consequência da supressão de centros enzimáticos relacionados às reações oxidativas do hospedeiro pelo parasito.

## 5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, H.; TUNHOLI-ALVES, V.M.; TUNHOLI, V.M.; GÔLO, P.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; PINHEIRO, J. Changes in the lipid profile of *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) (Gastropoda, Xanthonychidae) during the development of *Eurytrema coelomaticum* (Giard and Billet, 1892) (Digenea, Dicrocoeliidae). **Experimental Parasitology**, v.144, p.52-56, 2014.

BANDSTRA, S. R.; FRIED, B.; SHERMA, J. High-performance thin-layer chromatographic analysis of neutral lipids and phospholipids in *Biomphalaria glabrata* patently infected with *Echinostoma caproni*. **Parasitology Research**, v.99, p.414-418, 2006.

BORGES, C.M.C.; SOUZA, C.P.; ANDRADE, Z.A. Histopathologic features associated with susceptibility and resistance of *Biomphalaria* snails to infection with *Schistosoma mansoni*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.93, p.117–121, 1998.

CHAI, J. Y.; DARWIN MURREL, K.; LYMBERY, A. J. Fish-borne parasitic zoonoses: status issues. **International Journal for Parasitology**, v.35, p.1233-1254, 2005.

HOCH, F. L. Cardiolipins and biomembrane function. **Biochimistry Biophysical Acta**, v.1113, p.71–133, 1992.

LOKER, E. S.; HERTEL, L. A. Alterations in *Biomphalaria galabrata* plasma induced by infection with the digenetic trematode *Echinostoma paraensei*. **The Journal of Parasitology**, v.73, p.503–513, 1987.

MALDONADO JR., A.; COURA, R.; GARCIA, J.S.; LANFREDI, R.M.; REY, L. Changes on *Schistosoma mansoni* (Digenea: Schistosomatidae) worm load in *Nectomys squamipes* (Rodentia: Sigmodontinae) concurrently infected with *Echinostoma paraensei* (Digenea: Echinostomatidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.96, p.193–198, 2001.

MANTAWY, M.M.; MOHAMED, N.Z.; ARFA, A.F.; ALY, H.F. Carboxylic acids and their metabolic enzymes as new novel biomarkers of susceptible, resistant strains of *Biomphalaria alexandrina* and snails infected with *Schistosoma mansoni*. **International Journal of Scientific & Engineering Research**, v.04, p.1039-1047, 2013.

MOHAMED, A.M.; ISHAK, M.M. Comparative effects of schistosome infection and starvation on the respiratory transport chain of the snails *Biomphalaria alexandrina* and *Bulinus truncatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.71B, p.289–292, 1982.

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

PINHEIRO, J.; MALDONADO JR., A.; ATTÍAS, M.; LANFREDI, R.M. Morphology of the rediae of *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae) from its intermediate host *Lymnaea columella* (Mollusca, Gastropoda). **Parasitology Research**, v.93, p.171–177, 2004a.

PINHEIRO, J.; MALDONADO JR., A.; ATTIAS, M.; LANFREDI, R.M. Ultrastructure of the Miracidium of *Echinostoma paraensei* Lie and Basch, 1967 (Trematoda, Echinostomatidae). **Parasitology Research**, v.97, p.367–372, 2005.

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, 2004b.

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

ROBINSON, N. C. Functional binding of cardiolipin to cytochrome c oxidase. **Journal of Bioenergetic Biomembrane**, v.25, p.153–163, 1993.

SLUITERS, J. F.; BRUSSAARD-WUST, C. C. M.; MEULEMAN, E. A. The relationship between miracidial dose, production of cercariae, and reproductive activity of the host in the combination *Trichobilharzia ocellata* and *Lymnaea stagnalis*. **Zeitschrift fur Parasitenkunde**, v.63, p.13–26, 1980.

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

STOREY, K. B. Molecular mechanisms of metabolic arrest in mollusks. In *Surviving Hypoxia: Mechanisms of Control and Adaptation* (eds. P. W. Hochachka, P. L. Lutz, T. J. Sick, M. Rosenthal and G. van den Thillart), pp. 253–269. CRC Press, Boca Raton, 1993.

STUART, J.A.; OOI, E.L.; BALLANTYNE, J.S. Maximal activities of enzymes of intermediary metabolism in the estivating terrestrial snail *Cepaea nemoralis*. **Comparative Biochemistry Physiology B**, v.120, 417-423, 1998.

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

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, 2011a.

TUNHOLI, V.M.; MONTEIRO, C.O.; DA SILVA, L.C.; DOLINSKI, C.M.; DOS SANTOS, M.A.J.; RODRIGUES, M.L.A.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; PINHEIRO, J.; TUNHOLI-ALVES, V.M. Physiological alterations in *Bradybaena similaris* (Stylommatophora:Bradybaenidae) induced by the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis indica* (Rhabditida: Heterorhabditidae) strain LPP1. **Experimental Parasitology**, v.139, p.12-18, 2014.

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

TUNHOLI-ALVES, V.M.; TUNHOLI, V.M.; GÔLO, P.; LIMA, M.; GARCIA, J.; MALDONADO JR., A.; PONTES, E.G.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; PINHEIRO, J. Effects of infection by larvae of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda, Metastrongylidae) on the lipid metabolism of the experimental intermediate host *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Gastropoda). **Parasitology Research**, v. , p. , 2013.

TUNHOLI-ALVES, V.M.; TUNHOLI, V.M.; GÔLO, P.; LUSTRINO, D.; MALDONADO JR., A.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; RODRIGUES, M.L.A.; PINHEIRO, J. Lipid levels in

*Biomphalaria glabrata* infected with different doses of *Echinostoma paraensei* miracidia. **Experimental Parasitology**, v.128, p.212–216, 2011a.

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*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.108, p.203-208, 2011b.

TUNHOLI-ALVES, V.M.; TUNHOLI, V.M.A.; CASTRO, R.N.; SANT'ANA, L.; GARCIA, J.; THIENGO, S.C.; PINHEIRO, J.; MALDONADO Jr., A. Activation of anaerobic metabolism in *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Gastropoda) experimentally infected by *Angyostrongylus cantonensis* (Nematoda, Metastrongylidae) by high-performance liquid chromatography. **Parasitology International**, v. 63, p. 64-68, 2014.

TUNHOLI-ALVES, V.M.; TUNHOLI, V.M.A.; THIENGO, S.C.; PINHEIRO, J. Effects of infection by larvae of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda, Metastrongylidae) on the metabolism of the experimental intermediate host *Biomphalaria glabrata*. **Experimental Parasitology**, v.131, p.143-147, 2012.

VASQUEZ, R. E.; SULLIVAN, J. T. Effect of miracidial dose on adoptively transferred resistance to *Schistosoma mansoni* in the snail intermediate host, *Biomphalaria glabrata*. **The Journal of Parasitology**, v.87, p.460–462, 2001.

## 6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, foi possível concluir:

- a exposição por 5 e 50 miracídeos de *E. paraensei* em *B. glabrata* induziu o recrutamento de vias anaeróbias fermentativas, especialmente aquelas dependentes da lactato desidrogenase;
- a exposição por *E. paraensei* induziu um intenso processo inflamatório no complexo gônada-glândula digestiva no molusco hospedeiro comprometendo a capacidade funcional do órgão;
- uma redução no consumo de O<sub>2</sub> mitocondrial e, por conseguinte, diminuição na capacidade de fosforilação oxidativa foi constatada em *B. glabrata* infectada por *E. paraensei*.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A exposição tanto por cinco quanto por 50 miracídios de *E. paraensei* induziu a aceleração do processo de degradação anaeróbia de carboidratos em *B. glabrata*, por uma via bioquímica dependente da lactato desidrogenase, possibilitando o molusco hospedeiro obter energia (ATP) a partir da redução do ácido pirúvico. Esta condição metabólica representa um interessante processo de adaptação fisiológica do hospedeiro intermediário, assegurando a continuidade da via glicolítica bem como a capacidade deste em utilizar uma nova glicose como principal substrato energético imprescindível para a manutenção de suas funções vitais. A partir dos resultados histoquímicos obtidos, um intenso processo inflamatório na glândula digestiva do molusco hospedeiro foi verificado como consequência do desenvolvimento parasitário, comprometendo a capacidade funcional do órgão o que contribui em parte para a quebra da normoglicemia verificada nos períodos mais tardios da infecção. Adicionalmente, os resultados ainda revelam que o parasitismo por este equinostomatídeo causa consideráveis variações na fisiologia mitocondrial de *B. glabrata*. A diminuição no consumo basal de oxigênio mitocondrial e, por conseguinte, a redução na taxa de fosforilação oxidativa em moluscos infectados demonstra a sobreposição de vias anaeróbias fermentativas complementares. Tal cenário fisiológico observado nos organismos infectados pode ter sido estabelecido ou mediante a diminuição na densidade mitocondrial do tecido analisado, ou ainda, em consequência da supressão de centros enzimáticos relacionados às reações oxidativas do hospedeiro pelo parasito.

As alterações mais acentuadas foram demonstradas em moluscos submetidos a uma elevada carga parasitária (50 miracídios) em relação aos organismos expostos a cinco miracídios denunciando uma resposta dose-dependente. Ao analisar a variável tempo, as maiores variações foram observadas no final da terceira e quarta semanas de infecção em ambos os grupos parasitados, confirmando que este é o período de maior demanda energética pelo hospedeiro e pelas larvas do parasito em desenvolvimento. Este período coincide com a etapa de formação e maturação de rédias, estágios larvais caracterizados pela presença de uma boca primitiva, faringe muscular e intestino, permitindo às larvas alimentarem-se diretamente de tecidos da glândula digestiva de *B. glabrata*. Padrões diferentes a este são observados para ciclos de trematódeos envolvendo duas gerações de esporocistos. Neste contexto, as alterações fisiológicas constatadas no hospedeiro intermediário são mais pronunciadas nos

períodos iniciais da infecção e podem ser justificadas pela ausência de rédias durante o desenvolvimento ontogênico de tais helmintos.

A caracterização das alterações bioquímicas e histopatológicas em *B. glabrata* infectadas por *E.paraensei* demonstradas no presente estudo possibilitou a melhor compreensão desta relação, imprescindível para o desenvolvimento de novas drogas ou formulações mais seguras e eficazes destinadas no controle da população deste molusco hospedeiro. Esta proposta atende diretamente as especificações e recomendações apontadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 1983), a qual sugere que o controle das parasitoses transmitidas por tal hospedeiro seja baseado em medidas integradas voltadas no monitoramento e controle de populações de moluscos infectados.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

ANAZAWA, K. On a human case of *Echinostoma revolutum* and its infection route. **Taiwan Igahkai Zasshi**, v.288, p.221–241, 1929. (in Japanese).

BARÇANTE, T. A. **Aspectos do desenvolvimento de *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Kamensky, 1905 em *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818)**. 2006. 151f. Tese (Doutorado em Parasitologia). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

BARKER, M. G. Gastropods on land: phylogeny, diversity and adaptative morphology. In: BARKER, M. G. **The biology of terrestrial mollusks**. CABI Publishing, New York, USA, 2001. p. 01-146.

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

BISHOP, T.; OCLOO, A.; BRAND, M.D. Structure and function of mitochondria in hepatopancreas cells from metabolically depressed snails. **Physiological and Biochemical Zoology**, v.75, p.134-144, 2002.

BONNE, C. Echinostomias aan het Lindoemeer in Central-Celebes. **Ibidem**, v.81, p.1139–1167, 1941.

BONNE, C.; SANDGROUND, J.H. Echinostomiasis in Sulawesi as a result of eating mussels. **Geneeskundig Tijdschrift voor Nederlandsch-Indie**, v.79, p.2116–2134, 1939.

CHAI, J.Y. Echinostomes in humans. In: (Eds. B. Fried and R.Toledo) **The Biology of Echinostomes. From the molecule to the community**. Springer, New York, 147–183, 2008.

CHAI, J.Y.; LEE, S.H. Food-borne intestinal trematode infections in the Republic of Korea. **Parasitology International**, v.51, p.129 – 154, 2002.

CHIRSTENSEN, N. O.; SIMONSEN, P. E.; ODAIBO, A. B.; MAHLER, H. Establishment, survival and fecundity in *Echinostoma caproni* (Trematoda) infections in hamsters and girds. **Journal of the Helminthological Society of Washington**, v.57, p.104-107, 1990.

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, molluscs and fishes. **International Journal for Parasitology**, v.31, p.997-1011, 2001.

DILLON, R. T. The ecology of freshwater molluscs. Cambridge University Press, Cambridge, p.509, 2000.

ELSEOUD, S.M.F.; FATTAH, N.S.; DIN, H.M.; AL, H.A.; MOSSALEM, H.; ELLEBOUDY, N. Potential correlation between carboxylic acid metabolites in *Biomphalaria alexandrina* snails after exposure to *Schistosoma mansoni* infection. **Korean Journal of Parasitology**, v.50, p.119-126, 2010.

FRIED, B.; FRAZER, B.A.; LEE, M.S.; SHERMA, J. Thin layer chromatography and histochemistry analyses of neutral lipids in *Helisoma trivolvis* infected with four species of larval trematodes. **Parasitology Research**, v.84, p.369–373, 1998.

FRIED, B.; HUFFMAN, J. E. The biology of the intestinal trematode *Echinostoma caproni*. **Advances in Parasitology**, v.38, p.311-368, 1996.

FRIED, B. Infectivity, growth and development of *Echinostoma revolutum* (Trematoda) in the domestic chick. **Journal of Helminthology**, v.58, p.241-244, 1984.

FUJINO, T.; WASHIOKA, H.; SASAKI, K.; TONOSAKI, A.; FRIED, B. Comparative ultrastructure study of lamellar gastrodermal projections in *Echinostoma paraensei*, *E. caproni*, and *E. trivolvis* (Trematoda: Echinostomatidae). **Parasitology Research**, v.85, p.655-660, 1999.

GARRISON, P.E. A new intestinal trematode of man. **Philippine Journal of Science**, v.B3, p.385–393, 1908.

GRACZYK, T.K.; FRIED, B. Echinostomiasis: a common but forgotten food-borne disease. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.58, p.501–504, 1998.

GUPPY, J.; FUERY, C.J.; FLANIGAN, E. Biochemical principles of metabolic depression. **Comparative Biochemistry Physiology B**, v.109B, p.175–189, 1994.

HAND, S.C.; HARDEWIG, I. Downregulation of cellular metabolism during environmental stress: mechanisms and implications. **Annu. Rev. Physiology**, v.58, p.539–563, 1996.

HIRAZAWA, I. *Echinochasmus perfoliatus* (Ratz) found in man. **Tokyo Iji Shinshi**, v.2577, p.1328–1334, 1928. (in Japanese).

HOCH, F. L. Cardiolipins and biomembrane function. **Biochimistry Biophysical Acta**, v.1113, p.71–133, 1992.

HUFFMAN, J. E. Echinostomes in veterinary and wildlife parasitology. In: FRIED, B.; GRACZYK, T. K. **Echinostomes as experimental models for biological research**. Dordrecht: Kluwer, 2000. p.59-82.

HUFFMAN, J. E.; FRIED, B. *Echinostoma* and echinostomiasis. **Advances in Parasitology**, v.29, p.215-269, 1990.

HUMPHRIES, J. E.; REDDY, A.; FRIED, B. Infectivity and growth of *Echinostoma revolutum* (Froelich, 1802) in the domestic chick. **International Journal for Parasitology**, v.27, p.129-130, 1997.

IAVORKII, I.P. Interrelations in the *Fasciola hepatica*-water snail system. **Parazitologiya**, v.23, p.355-358, 1989.

ISHAK, M.M.; MOHAMED, A.M.; SHRAF, A.A. Carbohydrate metabolism in uninfected and trematode-infected snails *Biomphalaria alexandrina* and *Bulinus truncatus*. **Comparative Biochemistry Physiology (B)**, v.53, p.499–505, 1975.

KANEV, I. Life cycle, delimitation and redescription of *Echinostoma revolutum* (Fröelich, 1802) (Trematoda: Echinotomatidae). **Systematic Parasitology**, v.28, p.125-144, 1994.

KANEV, I; RADEV, V; STERNER, M; FRIED, B. An Overview on the Biology of Echinostomes. In: Echinostomes as Experimental Models for Biological Research. Fried, B; Craczyk, TK. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands, 1-30p. 2000.

KING, K. C.; MCLAUGHLIN, J. D.; GENDRON, A. D.; PAULI, B. D.; GIROUX, I.; RONDEAU, B.; BOILY, M.; JUNEAU, P.; MARCOGLIESE, D. J. Impacts of agriculture on the parasite communities of northern leopard frogs (*Rana pipiens*) in southern Quebec, Canada. **Parasitology**, v.134, p.2063-2080, 2007.

LAFFERTY, K. D. Foraging on prey that are modified by parasites. **The American Naturalist**, v.140, p.854-867, 1992.

LELES, D.; CASCARDO, P.; FREIRE ADOS, S.; MALDONADO JR., A.; SIANTO, L.; ARAUJO, A. Insights about echinostomiasis by paleomolecular diagnosis. **Parasitology International**, v.63, p.646–649, 2014.

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

LUTZ, A. Estudos sobre a evolução dos Endotrematodes brasileiros. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.17, p.55-57, 1924.

MAJIMA, M. On *Echinostoma macrorchis* found in man. **Kumamoto Igakkai Zasshi**, p.2252, 2260, 1927. (in Japanese).

MALDONADO JR., A.; COURA, R.; GARCIA, J.S.; LANFREDI, R.M.; REY, L. Changes on *Schistosoma mansoni* (Digenea: Schistosomatidae) worm load in *Nectomys squamipes* (Rodentia: Sigmodontinae) concurrently infected with *Echinostoma paraensei* (Digenea: Echinostomatidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.96, p.193–198, 2001B.

MALDONADO, A. JR.; GENTILE, R.; FERNANDES, C. M.; D'ANDREA, P. S.; LANFREDI, R. M.; REY, L. Helminth communities of *Nectomys squamipes* (Rodentia: Sigmodontinae) naturally infected by the exotic trematode *Schistosoma mansoni* in southeastern Brazil. **Journal of Helminthology**, v.80, p.369-375, 2006.

MALDONADO, A. JR.; 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, p.840–848, 2001A.

MANTAWY, M.M.; MOHAMED, N.Z.; ARFA, A.F.; ALY, H.F. Carboxylic acids and their metabolic enzymes as new novel biomarkers of susceptible, resistant strains of *Biomphalaria alexandrina* and snails infected with *Schistosoma mansoni*. **International Journal of Scientific & Engineering Research**, v.04, p.1039-1047, 2013.

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

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

MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASIL. 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. 2. ed. Brasília Editora do Ministério da Saúde - Série A. Normas e Manuais Técnicos, 2007. 178p.

MOHAMED, A.M.; ISHAK, M.M. Comparative effects of schistosome infection and starvation on the respiratory transport chain of the snails *Biomphalaria alexandrina* and *Bulinus truncatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.71B, p.289–292, 1982.

MOORE, J. Responses of an avian predator and its isopod prey to an acanthocephalan parasite. **Ecology**, v.64, p.1000-10015, 1983.

MOORE, J.; GOTELLI, N. J. A phylogenetic perspective on the evolution of altered host behaviours: A critical look at the manipulation hypothesis. In: BARNARD, C. J.; BEHNKE, J. M. **Parasitism and host behaviour**. 1. ed. Taylor and Francis: London, 1990. p.193-233.

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.

MULLICAN, S. K.; HUFFMAN, J. E.; FRIED, B. infectivity and comparative pathology of *Echinostoma caproni*, *Echinostoma revolutum* and *Echinostoma trivolvis* (Trematoda) in the domestic chick. **Comparative Parasitology**, v.68, p.256-259, 2001.

NABIH, L.; FATTAG, R.; RIZK, M; EL-ANSARY, A. Effect of magnesium and urea on glucose and glycogen content in schistosomiasis intermediate host. **Pakistan. J. Biochem.**, v.26, p.9-14, 1993.

PARAENSE, W. L.; ARAUJO, M. V. *Biomphalaria glabrata* no Estado do Piauí. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.79, n.3, p.385-387, 1984.

PARAENSE, W. L. Autofecundação e fecundação cruzada em *Australorbis glabratus*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.53, n.2-4, p.276-284, 1955.

PARAENSE, W. L. Estado atual da sistemática dos planorbídeos brasileiros. **Arquivo Museu Nacional Rio de Janeiro**, v.55, p.105-128, 1975.

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

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

PINHEIRO, J. **Morfologia e ultraestrutura dos ovos e estágios larvais de *Echinostoma paraensei* Lie & Basch, 1967 (Trematoda: Echinostomatidae) e fisiologia comparada da sua interação com *Lymnaea columella* Say, 1817 (Mollusca: Gastropoda)**. 2003. 116f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Biofísica). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.

ROHDE, K. The Aspidogastrea: An archaic group of Platyhelminthes. In: LITTLEWOOD, D. T. J.; BRAY, R. A. **Interrelationships of the Platyhelminthes**. 1. ed. London: CRC, 2001. P. 159-167.

SANDGROUND, J.H. On the occurrence of human echinostomiasis in Java. II. The discovery of an endemic focus of infection with *Echinostoma ilocanum* and the elucidation of the parasites life cycle. **Geneeskundig Tijdschrift voor Nederlandsch-Indie**, v.79, p.1722–1734, 1939.

SANDGROUND, J.H.; BONNE, C. *Echinostoma lindoensis* n. sp., a new parasite of man in the Celebes with an account of its life history and epidemiology. **The American Journal of Tropical Medicine**, v.20, p.511–535, 1940.

SANDGROUND, J.H.; PRAWIROHARDJO, S. On the occurrence of human echinotomiasis in Java. Preliminary report. **Geneeskundig Tijdschrift voor Nederlandsch-Indie**, p.1497–1503, 1939.

SANTOS, S. B.; PIMENTA, A. D.; THIENGO, S. C.; THOMÉ, J. W.; ABSALÃO, R. S.; MANSUR, M. C. D.; VIDIGAL, T. H. D. A.; FERNANDEZ, M. A.; TOMÁS, A. R. G.; MESQUITA, E. F. M.; SALGADO, N. C.; MATTHEWS-CASCON, H.; MARTINS, I. X.; ROCHA-BARREIRA, C.; KAWANO, T. Mollusca. In: ROCHA, R. M.; BOEGER, W. A. **Estado da arte e perspectiva para a Zoologia no Brasil**. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2009. p. 66-90.

SCHOTTLER, U. Weitere untersuchungen zun anaeroben energiestoffwechsel des polychaeten *Arenicola marina* L. *Zool Beitr NF* 1986; 30:141–52.

SIANTO, L.; REINHARD, K.J.; CHAME, M.; CHAVES, S.; MENDONCA, S.; GONCALVES, M.L.; FERNANDES, A.; FERREIRA, L.F.; ARAUJO, A. The finding of *Echinostoma* (Trematoda: Digenea) and hookworm eggs in coprolites collected from a Brazilian mummified body dated 600–1,200 years before present. **Journal of Parasitology**, v.9, p.972–975, 2005.

SLOSS, B.; MEECE, J.; ROMANO, M.; NOLLEN, P. The genetic relationships between *Echinostoma caproni*, *Echinostoma paraensei*, and *Echinostoma trivolvis* as determined by electrophoresis. **Journal of Helminthology**, v.69, p.243-246, 1995.

SOUZA, C. P.; LIMA, L. C.; JANNOTTI-PASSOS, L. K.; FERREIRA, S. S.; GUIMARÃES, C. T.; VIEIRA, L. B. F.; MARIANI, R. Moluscos límnicos da Microrregião de Belo Horizonte, Minas Gerais, com ênfase nos vetores de parasitoses. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.31, p.449-456, 1998.

SOUZA, C. P.; LIMA, L. C. Moluscos de interesse parasitológico do Brasil. Centro de Pesquisa René Rachou: Fiocruz; BH, p.76, 1990.

- STEWART, G.L.; UBELAKER, J.E.; CURTIS, D. Pathophysiologic alterations in *Biomphalaria glabrata* infected with *Angiostrongylus costaricensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.45, p.152–157, 1985.
- STOREY, K. B. Molecular mechanisms of metabolic arrest in molluscs. In: *Surviving Hypoxia: Mechanisms of Control and Adaptation*, edited by P. W. Hochachka, P. L. Lutz, T. J. Sick, M. Rosenthal, and B. van den Thillart. Boca Raton, FL: CRC, 1993, p. 253–269.
- STUART, J.A.; OOI, E.L.; BALLANTYNE, J.S. Maximal activities of enzymes of intermediary metabolism in the estivating terrestrial snail *Cepaea nemoralis*. **Comparative Biochemistry Physiology B**, v.120, 417-423, 1998.
- TAFT, S. J.; SUCHOW, K.; VANHORN, M. Helminths from some Minnesota and Wisconsin raptors. **Journal of Helminthological Society of Washington**, v.60, p.260-263, 1993.
- TEODORO, T. M.; JANOTTI-PASSOS, L. K.; CARVALHO, O. S.; CALDEIRA, R. L. Occurrence of *Biomphalaria cousini* (Mollusca: Gastropoda) in Brazil and its susceptibility to *Schistosoma mansoni* (Platyhelminths: Trematoda). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.57, p.144-151, 2010.
- THIENGO, S. C.; MATTOS, A. C.; BOAVENTURA, M. F.; LOUREIRO, M. S.; SANTOS, S. B., FERNANDEZ, M. A. Freshwater snails and schistosomiasis mansoni in the state of Rio de Janeiro, Brazil: V - Norte Fluminense Mesoregion. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.99, n.1, p.99-103, 2004.
- THOMPSON, S.N. Physiology and biochemistry of snail-larval trematode relationships. In: Fried B, Graczyk TK, editors. **Advances in Trematode Biology**. Florida, USA: CRC Press; p. 149–195, 1997.
- THOMPSON, S. N.; LEE, R.K.W. Comparison of starvation and infection by *Schistosoma mansoni* on tissue viability and the <sup>31</sup>P NMR spectrum of *Biomphalaria glabrata*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.72, p.417- 421, 1986.

TOFT, C. A.; AESCHLIMANN, A.; BOLIS, L. Parasite-host Associations: Coexistence or conflict? Oxford University Press, New York. 1991.

TOLEDO, R.; ESTEBAN, J.G.; Fried, B. Current status of food-borne trematode infections. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v.31, p.1705–1718, 2012.

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

TUAN, R.; SIMÕES, L. C. G. Effect of self-fertilization on *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835) (Pulmonata: Planorbidae). **Genetics and Molecular Biology**, v.21, n.4, p. 477-478, 1998.

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, 2011a.

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

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

TUNHOLI, V.M.; TUNHOLI-ALVES, V.M.; LUSTRINO, D.; CASTRO, R.; SANT'ANA, L.; GARCIA, J.; MALDONADO Jr., A.; DOS SANTOS, M.A.S.; RODRIGUES, M.L.A.; PINHEIRO, J. Aerobic to anaerobic transition in *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) infected with different miracidial doses of *Echinostoma paraensei* (Lie and Basch, 1967) by

highperformance liquid chromatography. **Experimental Parasitology**, v.133, p.403–410, 2013.

[TUNHOLII-ALVES, V.M.](#); TUNHOLI, V.M.A.; CASTRO, R.N.; SANT'ANA, L.; GARCIA, J.; THIENGO, S.C.; [PINHEIRO, J.](#); [MALDONADO Jr., A.](#) Activation of anaerobic metabolism in *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Gastropoda) experimentally infected by *Angyostrongylus cantonensis* (Nematoda, Metastrongylidae) by high-performance liquid chromatography. **Parasitology International**, v. 63, p. 64-68, 2014.

TUNHOLI-ALVES, V.M.; TUNHOLI, V.M.; GÔLO, P.; LUSTRINO, D.; MALDONADO JR., A.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; RODRIGUES, M.L.A.; PINHEIRO, J. Lipid levels in *Biomphalaria glabrata* infected with different doses of *Echinostoma paraensei* miracidia. **Experimental Parasitology**, v.128, p.212–216, 2011a.

WHITE, M. M.; CHEJLAVA, M.; FRIED, B.; SHERMA, J. Effects of various larval digeneans on the calcium carbonate content of the shells of *Helisoma trivolvis*, *Biomphalaria glabrata*, and *Physa* sp. **Parasitology Research**, v.95, n.4, p.252–255, 2005.

## 9 ANEXOS