

PARASITISMO EM *Megalobulimus elongatus* (Mollusca, Gastropoda)

CLIVIA VALLE MACHADO

Porto Alegre
Novembro de 2015

Parasitismo em *Megalobulimus elongatus* (Mollusca, Gastropoda)

Clivia Valle Machado

Trabalho de conclusão de curso de graduação
submetido à Universidade Federal do Rio Grande do
Sul como requisito parcial para a obtenção do título de
Bacharela em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a Denise M. Zancan

Co-orientadora: Prof^a Márcia Bohrer Mentz

Banca examinadora:

Prof. Dr. Luiz Carlos Kucharski

Prof. Dra. Neusa Saltiel Stobbe

Porto Alegre
Novembro de 2015.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer imensamente a Professora Denise Zancan pela paciência, disponibilidade, dedicação e orientação e também pelo apoio profissional e pessoal, pois sem o seu auxílio a conclusão deste trabalho não seria possível.

Agradeço muito a Professora Márcia Mentz pela disponibilidade, paciência e principalmente por me guiar com muita sabedoria pelo “mundo da parasitologia”.

Agradeço a toda equipe do laboratório de Neurobiologia Comparada pelo auxílio e disponibilidade em todos os momentos nos quais necessitei.

Agradeço a Débora do departamento de fisiologia pela paciência e pelo auxílio durante as análises bioquímicas.

Agradeço a todos os meus amigos que estiveram ao meu lado dando incentivo e promovendo ótimos momentos de descontração, pois foram essenciais no período do presente estudo

Agradeço a família do meu namorado pela compreensão e respeito pelo meu trabalho.

Agradeço muito a minha família pela dedicação e principalmente a minha mãe Vera e a minha avó Clarice pelo apoio incondicional, pois sem elas a conclusão deste trabalho não seria possível.

RESUMO

Dentre os moluscos, os gastrópodes constituem o grupo mais conhecido e com maior diversidade de formas, podendo assim adaptar-se a diferentes ambientes. Historicamente, estes animais vêm desempenhando o papel de hospedeiros intermediários, sendo em muitos casos, transmissores de doenças parasitárias de importância médica e veterinária. Este estudo objetivou verificar a ocorrência de parasitos de importância em saúde de gastrópodes da espécie *Megalobulimus elongatus*, coletados no município de Barra do Ribeiro, Rio Grande do Sul bem como analisar os efeitos do parasitismo através de parâmetros morfométricos e bioquímicos. Durante a dissecação dos animais, foram encontrados cistos em diferentes regiões do corpo. Estes foram retirados, quantificados e conservados em álcool 70° ou em solução Railliet-Henry para posterior análise. Ao final da dissecação, a região cefalopodal dos moluscos foi submetida à digestão artificial. Do total de 35 animais analisados, 24 apresentaram cistos contendo larvas de terceiro estágio de nematódeos do gênero *Strongyluris*. Os cistos foram encontrados com maior frequência nas regiões do teto da cavidade pulmonar e junto ao anel nervoso. As análises bioquímicas bem como o número de hemócitos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os moluscos infectados e não infectados. A ausência de diferenças significativas entre os parâmetros estudados pode indicar uma adaptação do hospedeiro à presença do parasito. Este estudo constitui o primeiro registro do nematódeo *Strongyluris* sp. em *Megalobulimus elongatus* naturalmente infectados no município de Barra do Ribeiro, RS.

Palavras-chave: Parasitismo, cistos, proteínas totais, glicemia, ureia, hemócitos, *Strongyluris*.

ABSTRACT

Among the Mollusca, gastropods are the most known and with greater diversity of forms, can adapt to different environments. Historically, these animals come playing the role of intermediate hosts, and in many cases, transmitters of parasitic diseases of medical and veterinary importance. This study aimed to verify the occurrence of parasites in gastropods of the species *Megalobulimus elongatus*, collected in the municipality of Barra do Ribeiro, Rio Grande do Sul as well as analyze the effects of parasitism by morphometric and biochemical parameters. Hemolymph was collected for the determination of total protein, urea, glucose and count of hemocytes. During the dissection of animals, cysts were found in different regions. These were removed, quantified and conserved in alcohol 70° or Railliet-Henry solution for further analysis. The cephalopodal mass of shelled mollusks and the eviscerated body of the slugs were individually minced and artificially digested. Of the total of 35 animals examined, 24 showed cysts containing larvae of third stage of helminths of the genus *Strongyluris*. The regions where the cysts were found more frequently were the pulmonary cavity ceiling and around the central ganglia. Biochemical analyses as well as the number of hemocytes showed no statistically significant differences between the shellfish infected and uninfected. The absence of significant differences between the studied parameters can indicate an adaptation of the host to the parasite. Histological and histobiochemical study will be conducted to check changes of this parasitism in snail host. This study, is the first record of nematode *Strongyluris* sp. in *Megalobulimus elongatus* naturally infected in the municipality of Barra do Ribeiro, Rio Grande do Sul, Brazil

Key words: Parasitism, cysts, total protein, glycemia, urea, hemocytes, *Strongyluris*.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURAS

Figura 1. *Megalobulimus elongatus* adulto. (A) Animal com corpo (porção cefalopodal) estendido. A seta indica o peristômio refletido. Escala = 1,5 cm. (B) Animais no seu hábitat no momento da coleta, em Barra do Ribeiro, RS. (Página 13)

Figura 2. Correlações do número de cistos com: (A) concentração de proteínas totais (g/dL) por indivíduo; (B) concentração ureia (mg/dL) por indivíduo; (C) concentração de glicose (mg/dL) por indivíduo (Página 18)

Figura 3. (A) Extremidade anterior da L3 de *Strongyluris* sp. apresentando o esôfago bulbiforme (seta grande) e cápsula bucal (seta pequena). (B) Extremidade posterior da L3 de *Strongyluris* sp. apresentando o ânus (seta grande) e a cauda curvada dorsoventralmente (seta pequena) (Página 20)

TABELAS

Tabela 1. Médias e desvios padrão do peso (g), largura (mm) e comprimento (mm) dos indivíduos da espécie *Megalobulimus elongatus* infectados e não infectados. (Página 16)

Tabela 2 Distribuição dos cistos nas regiões: teto da cavidade pulmonar (TP), cavidade renopericardial (RP), borda anterior do manto (BM), átrio (A), junto ao anel nervoso (AN) e junto ao reto (R). Valores expressos em número absoluto e em porcentagem do número total de cistos para adultos e jovens (entre parênteses) (Página 16)

Tabela 3. Médias e desvios padrão das concentrações de proteínas totais (g/dL), ureia (mg/dL) e glicose (mg/dL) em indivíduos da espécie *Megalobulimus elongatus* infectados e não infectados. (Página 17)

SUMÁRIO

RESUMO.....	4
ABSTRACT.....	5
LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	6
1 INTRODUÇÃO.....	8
2 JUSTIFICATIVA.....	11
2.1 Objetivos específicos.....	11
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1 Animais.....	12
3.2 Procedimentos experimentais.....	13
3.2.1 Pesquisa dos vermes parasitos.....	13
3.2.2 Coleta da hemolinfa.....	13
3.2.3 Contagem dos hemócitos circulantes.....	14
3.2.4 Análises bioquímicas.....	14
3.3 Digestão Artificial.....	14
3.4 Identificação dos vermes parasitos.....	15
3.5 Análise estatística.....	15
4 RESULTADOS.....	16
4.1 Parâmetros morfométricos	16
4.2 Distribuição dos cistos.....	16
4.3 Hemócitos	16
4.4 Análises bioquímicas.....	17
4.5 Resultado da digestão artificial.....	19
4.6 Proporção de infectados e identificação do verme parasito.....	19
5 DISCUSSÃO.....	21
6 CONCLUSÃO.....	24
7 PERSPECTIVAS.....	25
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26

1 INTRODUÇÃO

Entre as classes pertencentes ao filo Mollusca, a classe Gastropoda merece destaque pela sua importância médica, veterinária e econômica. Os gastrópodes representam aproximadamente 70% do número total de espécies do filo tendo representantes marinhos, dulcícolas e terrestres. A concha, quando presente, geralmente exibe forma espiralada e pode abrigar todo o animal ou apenas as vísceras (massa visceral). A maior parte dos gastrópodes apresenta uma estrutura bucal equipada com dentes que raspam o alimento, denominada rádula e cabeça bem diferenciada com estatocistos e um ou dois pares de tentáculos, associada a um pé muscular rastejador (massa cefalopodal) Apresentam também uma grande diversidade morfológica o que lhes confere uma maior adaptação a diferentes ambientes (Brusca & Brusca, 2003; Fortes, 2004, Rey, 2008).

As famílias de moluscos límnicos de importância médica e veterinária são: Ampullariidae, Tiaridae, Lymnaeidae, Planorbidae. Entre os moluscos terrestres destacam-se as famílias Achatinidae, Bradybaenidae, Bulimulidae, Subulinidae, Veronicelidae (Souza & Lima, 1990, Lima et al, 1992; Thiengo *et al.*, 2008; Oliveira et al., 2010; Andrade-Porto, et al, 2012). A família Megalobulimidae não tem sido citada entre as de maior interesse médico-veterinário.

Os gastrópodes foram os primeiros moluscos a serem relacionados à importância médica, fazendo parte do ciclo biológico de um parasito (Lutz, 1921). Desde então, vários trabalhos realizados pelo mundo tem apontado os gastrópodes como hospedeiros intermediários de parasitos, principalmente enfatizando a importância médica e veterinária destas interações (Woodruff & Upatham, 1992; Abrous et al., 1999; Amaya et al, 2014; Luka E Mbaya, 2015).

No Brasil, as principais doenças às quais os moluscos encontram-se relacionados são a esquistossomose, a fasciolose e a angiostrongilíase (Souza & Lima, 1990, Lima et al, 1992, Rey, 2008; Barbosa et al., 2013; Vasconcelos et al., 2009 Andrade-Porto, et al, 2012).

A relação parasito-hospedeiro mais conhecida no país geralmente ocorre entre planorbídeos, moluscos pulmonados de água doce, do gênero *Biomphalaria* sp. e o trematódeo *Schistosoma mansoni*, resultando na doença humana esquistossomose (Rey, 2008; Vasconcelos et al., 2009; Barbosa et al., 2013;). A esquistossomose provoca

diversas alterações no homem, desde alergias locais até lesões hepáticas cardiopulmonares, renais e neurológicas (Rey, 2008).

A fasciolose é outra enfermidade parasitária causada pelo trematódeo *Fasciola hepatica* que se localiza no fígado de herbívoros e humanos. Tem como hospedeiro intermediário preferencial os moluscos pulmonados de água doce do gênero *Lymnaea* e é encontrado com maior frequência em áreas de produção animal (Rey, 2008).

A angiostrongilíase abdominal é causada pelo nematódeo *Angiostrongylus costaricensis*, que tem como hospedeiros definitivos roedores e acidentalmente humanos, havendo vários casos no Brasil (Ayala et al., 1987; Graeff-Teixeira et al., 1993), cuja patologia inclui trombose e inflamações intestinais (Morera, 1988; Rey, 2008). Este parasito não possui especificidade por hospedeiro intermediário, podendo ser encontrado em várias espécies de gastrópodes (Graeff-Teixeira et al., 1993; Rambo et al., 1997).

No Estado do Espírito Santo, Caldeira et al. (2007) encontraram vários caracóis infectados naturalmente pelo nematódeo *Angiostrongylus cantonensis*. Em humanos este nematódeo leva a um quadro de meningite eosinofílica, com casos já registrados no país (Caldeira et al., 2007; Maldonado Jr. et al., 2010). Além disso, o gênero *Angiostrongylus* também possui espécies de importância veterinária como *Angiostrongylus vasorum* que se instala na artéria pulmonar e no coração de cães causando desde problemas respiratórios até a morte do hospedeiro (Traversa et al., 2013; Di Cesare et al., 2015).

Os moluscos que desempenham o papel de intermediários, assim como os definitivos, também podem ser afetados, não apenas quanto à condição imunitária e nutricional, mas também na taxa de crescimento e desenvolvimento reprodutivo (Mccarthy et al., 2003), interferindo também no comportamento e evolução do hospedeiro (Moné et al., 2011). Em *Biomphalaria glabrata*, infecções experimentais com o nematódeo *Angiostrongylus cantonensis* resultaram na alteração do metabolismo de proteínas, carboidratos e lipídios (Tunholi-alves et al., 2011, 2012, 2013, 2014). Em *Bradybaena similaris* foram encontradas mudanças dos padrões de excreção do caracol após infecção experimental pelo nematódeo *Heterorhabditis indica* (Tunholi et al., 2014). No caracol “gigante” africano *Achatina fulica*, introduzido no Brasil, também se observou alteração nas concentrações de proteínas totais, uréia e ácido úrico após a infecção experimental por *Angiostrongylus cantonensis* (Tunholi-alves et al., 2015).

A fauna de gastrópodes do Rio Grande do Sul, até o ano de 2010, foi estimada em 79 espécies nativas e sete espécies exóticas (síntese apresentada pelo grupo temático da fauna: Buckup, 2010).

Achatina fulica é um molusco exótico de hábito generalista e de rápida dispersão podendo ser encontrado em diversos estados do país (Thiengo et al., 2007; Zanol et al., 2010) inclusive no Rio Grande do Sul (Agudo-Padrón, 2009). Foram introduzidos antropicamente no país na década de 1980 com o objetivo comercialização para consumo humano, em substituição ao escargot (*Helix aspersa*), o qual fracassou poucos anos depois e teve como resultado a soltura destes animais na natureza. Como consequência, estes moluscos passaram a competir, por território e alimentação com os “gigantes” nativos das famílias Megalobulimidae, Strophocheilidae e Bulimulidae (Thiengo et al., 2007; Colley & Fischer, 2009; Zanol et al., 2010; Agudo-Padrón, 2012). A *fulica* também aparece como praga agrícola e por isso desde 2001 foram desenvolvidos programas de controle destes moluscos pelo Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) (Colley & Fischer, 2009). Além do mais, em razão do molusco africano apresentar registro de infecção pelo nematódeo *Angiostrongylus* em outros países (Kliks & Palumbo, 1992), *A. fulica* foi divulgado pela mídia como o principal vetor do nematódeo no país (Fisher et al., 2015), o que induziu a população a exterminar vários moluscos sem discriminar as espécies nativas da *Achatina fulica*, colocando em risco as populações de espécies nativas (Thiengo et al., 2007; Colley & Fischer, 2009).

A família Megalobulimidae é composta apenas pelo gênero *Megalobulimus* Müller, 1878 e são conhecidos popularmente como caracois gigantes devido ao seu tamanho que pode chegar até 160 mm (Fontenelle, 2012). Esta família distribui-se por toda América do Sul (Bequaert, 1948) e é apontada como a mais afetada com a introdução do caracol africano tanto na natureza quanto em locais habitados pelo homem (Colley & Fischer, 2009).

O gênero *Megalobulimus* vem sendo utilizado em estudos morfológicos e fisiológicos e sobre parasitismo. Em 1995, Thiengo encontrou infecção natural por larvas do nematódeo *Strongyluris* em uma espécie não identificada do gênero *Megalobulimus*, enquanto procurava por helmintos de interesse em saúde pública nos municípios de Santa Rosa (RS) e em Uberlândia (MG).

Uma espécie comum no sul do Brasil é *Megalobulimus abbreviatus* Bequaert 1948 (MNRJ 13283), que vem sendo utilizada como modelo experimental para estudos

fisiológicos e neurobiológicos (Martinez-Pereira et al. 2013; De Fraga et al., 2004, 2010; Kalil-Gaspar et al., 2007; Rigon et al., 2010; Swarowsky et al., 2005; Zancan et al., 1997). Também já foi estudada dentro do parasitismo no qual foi infectada experimentalmente por *Angiostrongylus costaricensis*, para avaliar a capacidade de infecção e manutenção dos estágios larvais como hospedeiro intermediário, no entanto não mostrou especificidade (Graeff-Teixeira et. al 1993).

Outra espécie, *Megalobulimus elongatus* Bequaert 1948, foi também coletada para fins de estudos neurobiológicos em nosso laboratório, porém sua utilização foi inviabilizada devido à presença de cistos de parasito em várias regiões do corpo inclusive ligados aos gânglios centrais (dados não publicados). Poucos trabalhos são encontrados sobre a espécie *Megalobulimus elongatus*, contudo sabe-se que apresenta registro no sul do Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai, e podem ser distinguidas das demais espécies do gênero através de características conquiológicas pela ornamentação da protoconcha e posição da espira em relação à volta corporal (COLLEY, 2013)

2 JUSTIFICATIVA

Não encontramos até o momento trabalhos que citam esta espécie como hospedeiro de nematódeos. Com a preocupação no reconhecimento das características parasitárias dos espécimes de nematódeos encontrados, bem como os possíveis efeitos destas no hospedeiro, este trabalho teve como objetivos identificar a(s) espécie(s) de parasita(s) encontrada (as) em *Megalobulimus elongatus* e avaliar algumas alterações metabólicas e morfológicas causadas pela infecção do parasito na espécie *M. elongatus*.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar os parasitos encontrados
- Verificar a localização, o número e o gênero dos parasitos encontrados.
- Analisar os efeitos do parasitismo nos moluscos utilizando de parâmetros morfométricos e bioquímicos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foi realizada uma coleta de moluscos adultos e jovens da espécie *M. elongatus* Bequaert 1948 MNRJ 13248 (Figura 1) no Município de Barra do Ribeiro (30°22'21"S – 51°25'50"W), Rio Grande do Sul, Brasil em setembro de 2015. Os caracóis adultos, com crescimento máximo da concha mostraram o peristômio refletido (a presença deste engrossamento da borda da concha indica o término de crescimento da concha) (Figura 1). Alguns animais com desenvolvimento reprodutivo (confirmado no momento da dissecação), com comprimento da concha variando entre 59,3 a 74,2mm, mas sem bordo refletido, também foram considerados adultos. Os espécimes jovens possuíam o comprimento de concha entre 37 a 66,9 mm.

Os 35 moluscos coletados foram mantidos em terrários telados no Laboratório de Neurobiologia Comparada (Departamento de Fisiologia, UFRGS), sob condições controladas de temperatura (22 – 26°C), umidade e fotoperíodo (12 h claro/12 h escuro; fotofase: 7 h – 19 h) e alimentados diariamente com alface e água *ad libitum*, conforme descrito na literatura (MARTINEZ-PEREIRA, 2013).

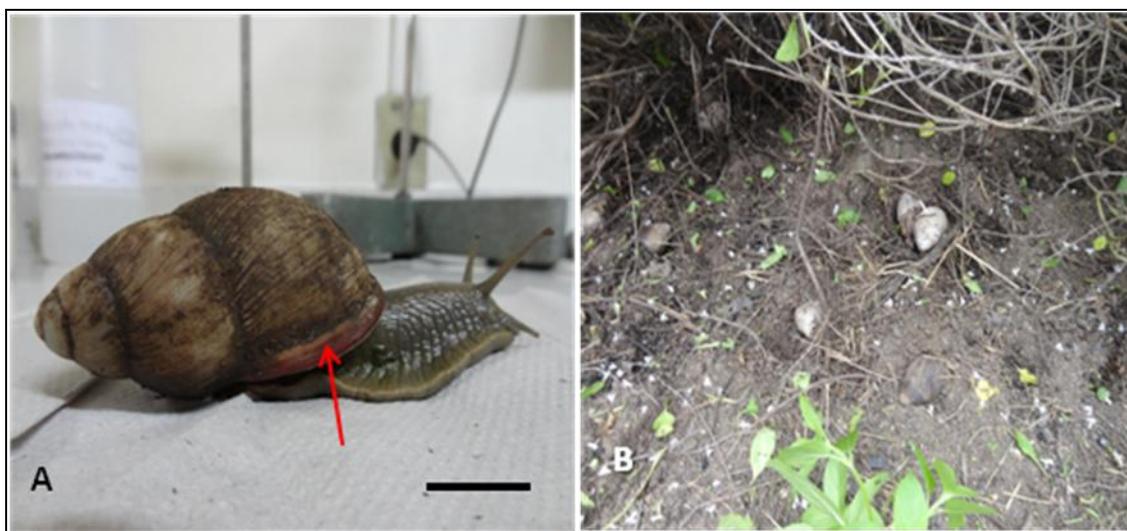


Figura 1. Adulto de *Megalobulimus elongatus*. (A) Animal com corpo (porção cefalopodal) estendido. A seta indica o peristômio refletido. Escala = 1,5 cm. (B) Animais no seu hábitat no momento da coleta, em Barra do Ribeiro, RS.

3.2 Procedimentos experimentais

Antes do início dos experimentos, todos os 35 animais foram pesados com o auxílio de uma balança de precisão e medidos quanto ao comprimento e largura da concha, através de um paquímetro.

A escolha de cada caracol para os diferentes experimentos ocorreu de forma aleatória. A análise de cistos (item 3.2.3) foi realizada em todos os caracois ($n = 35$). Após a retirada dos cistos, 20 animais foram dissecados e os tecidos retirados (glândula hepatopâncreas, intestino e reto) foram fixados para a análise histológica posterior (estes dados não estão incluídos no presente trabalho). Nos outros 15 caracois foi realizada a coleta da hemolinfa e a digestão artificial.

Todos os animais foram anestesiados antes da dissecação por meio de imersão em solução saturada de mentol dissolvida em solução fisiológica para a espécie *M. abbreviatus* (29,5 mM NaCl, 2,4 mM KCl, 6 mM CaCl₂) por 40 minutos (JAEGER, 1961), sendo esta dose letal para os moluscos.

3.2.1 Pesquisa dos vermes parasitos

Os moluscos foram analisados sob microscópio cirúrgico (D. F. Vasconcelos, Brasil) para a pesquisa de cistos de vermes parasitos e estes quantificados por região anatômica: teto da cavidade pulmonar (TP), borda anterior do manto (BM), cápsula de tecido conjuntivo que reveste a cavidade renopericardial (RP), interior do átrio (A), junto ao anel nervoso (AN) e ligado ao reto (R). Os parasitos encontrados foram coletados com pinça e conservados em álcool 70% para a posterior identificação.

3.2.2 Coleta da hemolinfa

Foram utilizados 15 moluscos e estes foram colocados no gelo por no máximo 1 minuto para analgesia e em seguida foi realizada uma abertura na concha até cavidade renopericardial no qual se coletou 100 µL/indivíduo de hemolinfa por meio de punção intraventricular com o uso seringas de insulina heparinizadas. As amostras foram colocadas em tubos de eppendorf heparinizados e mantidas no gelo para utilização nas análises bioquímicas (item 3.2.4).

3.2.3 Contagem dos hemócitos_circulantes

Para contagem de hemócitos, utilizou-se 10 µL de cada amostra de hemolinfa e analisadas na Câmara de Neubauer espelhada (New Optics). Após 2 minutos, a lâmina foi analisada em microscópio óptico (Nikon E600) no aumento de 40x. O reconhecimento e a contagem dos hemócitos seguiram como referência Rohr & Amato (2014). Valores expressos em número de hemócitos/10 µL.

3.2.4 Análises bioquímicas

Alíquotas da amostra de hemolinfa foram utilizadas para verificar a concentração de proteínas, uréia e glicose, com a utilização de um kit (Labtest) para proteínas totais, ureia CE e glicose liquiform, respectivamente, seguindo as orientações do fabricante. Para a dosagem de proteínas totais e glicose utilizou-se 10 µL de amostra e para uréia, 40 µL. As amostras foram incubadas por 10 min. a 37°C. Todas as amostras para dosagem de proteínas totais, ureia e glicose foram lidas em espectrofotômetro (Ultraspec 2000 Pharmacia Biotech) em 545, 600 e 505 nm, respectivamente. Os valores de proteínas totais foram expressos em g/dL enquanto que a ureia e glicose em mg/dL.

3.3 Digestão Artificial

A massa cefalopodal de 11 caracóis adultos e 4 jovens, selecionados ao acaso, foi seccionada em pedaços pequenos (de 3 a 5 mm³) para facilitar a ação da enzima, colocada em 0,4 mg% Pepsina (Delaware®) dissolvida em solução de 0,7% de HCl e aquecida por 2 horas a 37°C. Após este período de incubação, o tecido foi colocado em um funil de Baermann, no qual permaneceu 6 h sedimentando até o exame. A partir da parte inferior do funil de Baermann foi coletada 10 ml de solução em placa de Petry e examinada sob microscópio (estereoscópico e óptico com objetiva de 40x), à procura de helmintos (técnica modificada por Thiengo *et al.*, 2008).

3.4. Identificação do verme parasito

As estruturas parasitárias encontradas foram fixadas em solução de Railliet-Henry (0.85% NaCl solution: 93 ml; formaldehyde: 5 ml; glacial acetic acid: 2 ml) aquecida a 60°C, montadas em lâminas com lamínula e analisadas quanto à morfologia em microscópio estereoscópico (Olympus), com aumento = 100x. Todos os exemplares foram classificados conforme a literatura disponível (Ash, 1970; Bain, 1970; Thiengo, 1995; De Oliveira et al., 2010). Os registros fotográficos foram realizados com o auxílio de câmera digital acoplada ao microscópio.

3.5. Análise estatística

Foi utilizado o teste t de Student não paramétrico para as análises bioquímicas e morfométricas com intervalo de confiança de 95%, no qual $p < 0,05$ é significativo. Também foi utilizado o teste de correlação de Pearson para as análises bioquímicas, sendo $r=1$ ou $r=-1$ totalmente correlacionado. Ambos os testes foram realizados com o programa Sigma Plot 11.0.

4 RESULTADOS

4.1 Parâmetros morfométricos

Não encontramos diferenças significativas entre jovens infectados e não infectados, com relação às medidas de peso, largura e comprimento do animal ($p > 0,05$). O mesmo foi observado na comparação destas medidas entre os adultos infectados e não infectados (Tabela 1). Como os animais foram coletados na primavera, época reprodutiva do *Megalobulimus*, os caracóis adultos mostravam ovotestis e glândula de albúmen bem desenvolvida.

Tabela 1. Médias e desvios padrão do peso (g), largura (mm) e comprimento (mm) dos indivíduos da espécie *Megalobulimus elongatus* infectados e não infectados.

	Peso (g)	Compr. (mm)	Largura (mm)
	média±dp	média±dp	média±dp
Infectados	41.6±15.6	62.1±8.7	33.0±3.8
Não infectados	34.3±17.1	57.5±10.5	31.4±3.9

4.2 Distribuição dos cistos

As regiões de distribuição dos cistos apresentaram as seguintes proporções: TP (45%), RP (3%), BM (7%), A (1%), AN (42%) e R (2%) (Tabela 2). As regiões TP e AN exibiram maior presença de cistos, totalizando 87% da prevalência nos moluscos.

Tabela 2. Distribuição dos cistos nas regiões: teto da cavidade pulmonar (TP), cavidade renopericardial (RP), borda anterior do manto (BM), átrio (A), junto ao anel nervoso (AN) e junto ao reto (R). Valores expressos em número absoluto e em porcentagem do número total de cistos para adultos e jovens (entre parênteses)

	TP		RP		BM		A		AN		R		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Adultos	87	(41%)	7	(3,3%)	11	(5,2%)	3	(1,4%)	41	(19,3%)	3	(1,4%)	152	(71%)
Jovens	9	(4,2%)	0,0		3	(1,4%)	0,0		47	(22,2%)	1	(0,5%)	60	(28,3%)
Total	96	(45,3%)	7	(3,3%)	14	(6,6%)	3	(1,4%)	88	(41,5%)	4	(1,9%)	212	(100%)

4.3 Hemócitos

O número de hemócitos por indivíduo não apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparados os infectados (média = 48,33) com variação de 11 a 132 hemócitos por indivíduo aos não infectados (média = 49,29) com variação de 10 a

109 hemócitos por indivíduo, $p=0.75$. A contagem dos hemócitos dos jovens foi realizada em apenas quatro animais. Destes, a contagem nos dois animais infectados (30 e 52) não diferiu dos dois animais não infectados (11 e 35), $p= 0.384$. Entre os caracóis adultos infectados e não infectados também não foi encontrada diferença significativa. Destes, os animais infectados (média = 52,6) apresentaram variação de 10 a 109 hemócitos e não infectados (média= 61) apresentaram variação de 13 a 132 hemócitos, ($p= 0.784$).

Não se encontrou correlação entre a quantidade de cistos e o número de hemócitos por indivíduo nos animais infectados ($r = -0,290$), não diferindo significativamente.

4.4 Análises bioquímicas

As análises bioquímicas da concentração de proteínas totais, ureia e glicemia entre os animais infectados e não infectados (Tabela 3) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, $p > 0,05$.

Não foram encontradas correlações significativas entre o número de cistos por indivíduo com a concentração de proteínas totais ($r = 0,58$), com a concentração de ureia ($r = -0,03$) ou com a concentração glicose ($r = -0,14$) hemolinfáticos (Figura 2).

Tabela 3. Médias e desvios padrão das concentrações de proteínas totais (g/dL), ureia (mg/dL) e glicose (mg/dL) em indivíduos da espécie *Megalobulimus elongatus* infectados e não infectados.

	Prot. Tot. (g/dL)	Uréia (mg/dL)	Glicose (mg/dL)
Infectados	1.32±0.69	5.61±3.15	4.80±1.87
Não infectados	2.09±1,01	5.69±3.96	4.49±2.61

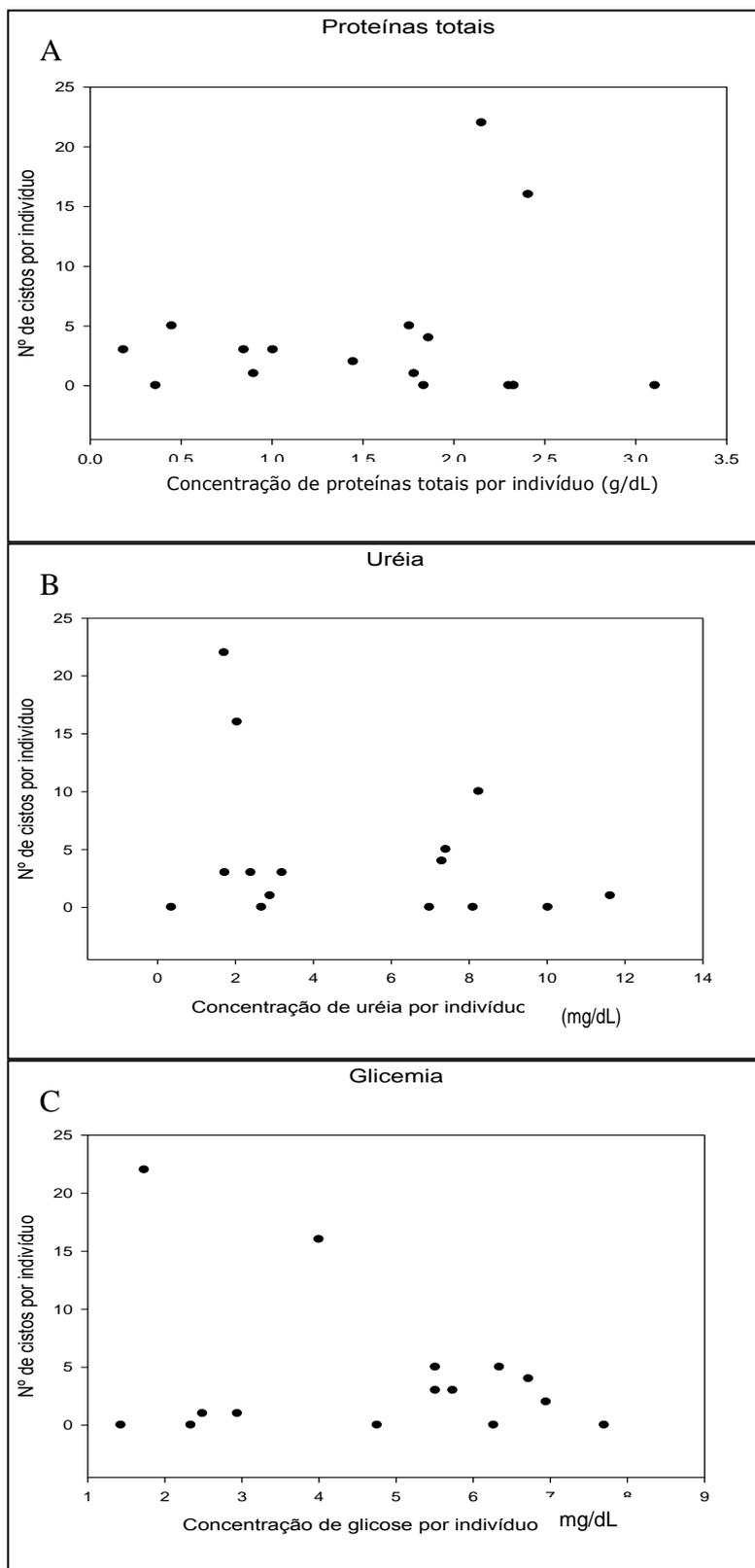


Figura 2. Correlações do número de cistos com: (A) concentração de proteínas totais por indivíduo em g/dL; (B) concentração ureia por indivíduo em mg/dL; (C) concentração de glicose por indivíduo em mg/dL.

4.5 Resultado da digestão artificial

Pelo método da digestão artificial foram encontradas 7 larvas L3 de *Strogyluris* sp. apenas na massa cefalopodal de um animal juvenil. Nos demais, cuja massa cefalopodal foi analisada, não foram encontradas larvas de outros helmintos.

4.6 Proporção de infectados e identificação do verme parasito

De um total de 35 *Megalobulimus elongatus* analisados, 24 (68,6%) apresentaram-se infectados com larvas do nematódeo *Strongyluris* Mueller, 1894 família Heterakidae. Dentre os moluscos infectados 17 (70,8%) eram adultos e 7 (29,2%) jovens.

A fase evolutiva de terceiro estágio (L3) foi encontrada dentro de cistos. A confirmação deste estágio foi realizada pelas características que distinguem o presente gênero dos demais que são: extremidade anterior apresentando na extremidade anterior lábios com papilas, cápsula bucal, anel nervoso posicionado no terço médio do esôfago que terminava em um bulbo esofagiano, intestino com a extremidade anterior dilatada e na extremidade posterior a presença de ânus e cauda curvada dorsoventralmente. As larvas encontradas mediam entre 4,6 e 6,3mm de comprimento e 0,54 – 0,76mm de largura (Figura 3).

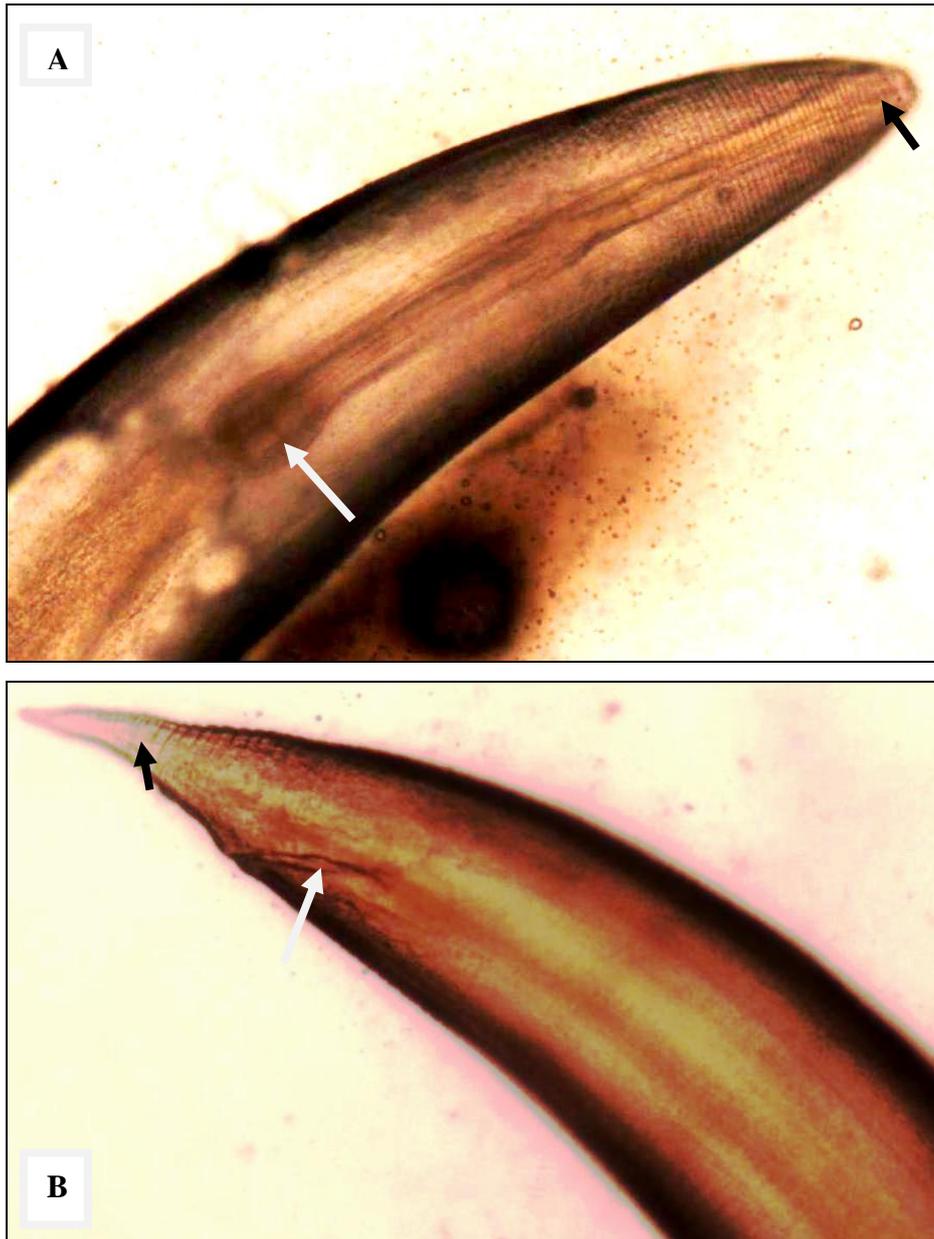


Figura 3. (A) Extremidade anterior da L3 de *Strongyluris* sp. apresentando o esôfago bulbiforme (seta branca) e cápsula bucal (seta preta).(B) Extremidade posterior da L3 de *Strongyluris* sp. apresentando o ânus (seta branca) e a cauda curvada dorsoventralmente (seta preta).

5 DISCUSSÃO

A presença do nematódeo *Strongyluris* sp. já foi documentada no Brasil parasitando *Achatina fulica* coletados nos estados de Goiás (De Oliveira et al., 2010) e Rio de Janeiro (Maldonado Jr. et al., 2010). Ainda, Thiengo (1995) encontrou larvas deste parasito infectando uma espécie do gênero *Megalobulimus* sp. coletados nos municípios de Santa Rosa (RS) e Uberlândia (MG). No município de Barra do Ribeiro (RS), o nematódeo *Strongyluris* sp. está sendo documentado pela primeira vez no caracol nativo *Megalobulimus elongatus*.

Strongyluris sp. foi encontrado no intestino grosso do lagarto *Tropidurus torquatus* Wied, presente na região nordeste (Kohn et al., 1973) e *Tropidurus oreadicus*, da região amazônica (Dos Santos et al., 2013). Os lagartos são considerados os hospedeiros definitivos. Encontramos apenas duas citações da ocorrência de anfíbios (sem identificação de espécie nestas referências) infectados por *Strongyluris* sp. adultos (Vicent et al., 1993; Anderson et al., 2009). Não encontramos relatos associando este nematódeo como parasito humano. Mamíferos domésticos podem ser hospedeiros acidentais deste helminto (Vicente et al., 1993). Sua transmissão é unicamente trófica podendo ser ingeridos, facultativamente, por um hospedeiro intermediário no estágio larval L1, permanecerem encistados dentro dele até a fase de L3, para que então seja consumido pelo hospedeiro definitivo. O desenvolvimento das demais fases (L4 e adulto) ocorre após a ingestão do hospedeiro intermediário pelo hospedeiro definitivo (répteis e anfíbios) (Bain, 1970; Chabaud, 1971).

A distribuição dos cistos em *M. elongatus* evidenciou que as áreas preferenciais dos cistos foram a cavidade pulmonar ligados ao manto que constitui o teto da cavidade e associados com o anel nervoso, o qual constitui o sistema nervoso central do animal. A localização de cistos de *Strongyluris* sp. na cavidade palial, ou cavidade pulmonar, também foi descrita em *Megalobulimus* sp. (Thiengo 1995). O teto da cavidade pulmonar possui muitos vasos sanguíneos onde são realizadas trocas gasosas e, dessa forma, há uma grande taxa de irrigação de hemolinfa nesta região. Esta característica pode explicar a localização preferencial dos cistos nesta região, visto que as larvas podem obter mais nutrientes, mesmo que o metabolismo da larva L3 possa ser baixo, já que não foram encontradas alterações significativas nos parâmetros bioquímicos sanguíneos de *M. elongatus*. Outra região com muito irrigação sanguínea é o sistema nervoso, no qual foram descritos muitos capilares (Nóblega et al. 2003).

Foi observado no caramujo marinho *Littorina saxatilis*, infectado pelo trematódeo digenético *Microphallus piriformes*, um quadro de castração parasitária que teve como consequência o aumento no tamanho do caramujo. Este aumento ocorreu em resposta à destruição das suas gônadas pelo parasito com o objetivo de expandir o espaço disponível no corpo do animal para favorecer o desenvolvimento do ciclo parasitário (Mccarthy et al., 2004). No presente trabalho, a ausência de alteração nas medidas das dimensões corporais e do peso corporal observadas em jovens e adultos infectados em relação aos não infectados nos indica que este parasito não parece interferir no crescimento de *M. elongatus*.

Encontramos uma maior prevalência de cistos junto ao anel nervoso dos moluscos juvenis, diferentemente dos adultos que apresentaram a sua maior quantidade de cistos no teto da cavidade pulmonar. A preferência dos cistos pela região próxima ao anel nervoso nos jovens pode ser consequência do pouco espaço existente na cavidade pulmonar destes caracóis, sendo assim o parasito buscaria outras áreas disponíveis e que, ainda, pudessem fornecer aporte adequado de nutrientes. Em indivíduos adultos, como o espaço da cavidade pulmonar é maior, não é necessária a grande ocupação das áreas próximas ao anel nervoso pelos cistos

O elevado número de cistos em indivíduos adultos pode ser explicado pelo ciclo de vida longo caracol *Megalobulimus*. Um dos pré-requisitos para a ocorrência do parasitismo natural envolve a ecologia, no qual ambos, hospedeiro e parasito, devem ocupar a mesma localização (Rey, 2008). Como o parasito possui sobreposição de hábitat com o molusco, estes com mais tempo de vida acabam tendo uma maior carga parasitária devido à exposição prolongada, quando comparado com os jovens.

A digestão artificial é um método comumente utilizado em gastrópodes para verificar a presença de parasitos na porção muscular (massa cefalopodal) (Thiengo, 1995; Graeff-Teixeira et al., 1993; de Oliveira et al., 2010). No presente estudo foram encontrados apenas larvas de *Strongyluris* sp. por este método, diferente do que já foi registrado em outros gastrópodes pulmonados, nos quais foi encontrada mais de uma espécie de parasito pela digestão artificial. Como é o caso de *Achatina fulica*, na qual se observou a presença simultânea de larvas de *Aelurostrongylus abstrusus*, *Rhabditis* sp., *Strongyluris* sp., ou de combinações de ao menos duas destas espécies, além de outros metastrongilídeos, (De Oliveira et al., 2010).

Quando se inoculou parasitos experimentalmente em moluscos gastrópodes, foi observada na hemolinfa dos indivíduos parasitados a diminuição significativa das

proteínas totais, aumento na concentração de ureia e diminuição de ácido úrico, diminuição significativa nas concentrações de colesterol e triacilglicerol, além da diminuição dos níveis de glicose (Tunholi-Alves et al. 2011, 2012, 2013, 2014).

O número de hemócitos circulantes na hemolinfa dos caracóis não apresentou diferenças entre infectados e não infectados. Ford et al. (1993) calcularam a densidade dos hemócitos de ostras resistentes e suscetíveis ao parasitismo. Os animais resistentes a infecção apresentaram uma maior densidade de hemócitos com o aumento da carga parasitária, enquanto as suscetíveis não apresentaram alterações. A ausência de alteração no número de células imunitárias em uma situação de infecção parasitária exatamente nos animais que são suscetíveis à infecção sugere que quando o parasito é natural de um hospedeiro o sistema imunitário deste responde menos à presença do parasito.

A ausência de alterações bioquímicas significativas entre animais infectados e não infectados pode ser explicada pelos mecanismos de adaptação do hospedeiro ou do parasito. O caracol pode sofrer seleção natural para ser suscetível ou resistente ao parasito (Rey, 2008), ou o parasito pode sofrer adaptações de forma a não ser percebido pelo sistema de defesa do hospedeiro, por meio de modificações morfológicas ou fisiológicas (Chabaud, 1971). Como não foi encontrada correlação significativa entre o número de cistos e as concentrações de proteínas totais, ureia e glicose, mesmo que o número amostral seja pequeno, pode-se sugerir que o nematódeo *Strongyluris* sp. adaptou-se a esta espécie de hospedeiro, de forma a não provocar alterações notáveis na homeostasia do hospedeiro. A presença do nematódeo *Strongyluris* sp. em *M. elongatus* também não ocasionou alterações morfológicas macroscópicas, nem na reprodução dos caracóis adultos, os quais encontravam-se em prontidão reprodutiva no período da coleta. Essas evidências reforçam a ideia de que o nematódeo *Strongyluris* sp. possa ser parasito natural do caracol *Megalobulimus elongatus*. Embora ainda sejam necessários estudos complementares, como análise histológica para identificar outras fases larvais ou a identificação de possíveis predadores do caracol que atuariam como hospedeiro (s) definitivo (s) deste nematódeo, estes dados preliminares indicam que o parasitismo da espécie *Megalobulimus elongatus* por *Strongyluris* sp. É importante também considerar que a ausência de alterações, tanto bioquímicas como morfométricas, sugere que o *Megalobulimus elongatus* possa desempenhar o papel de hospedeiro paratênico. A identificação de larvas em outros estágios nos tecidos que serão analisados poderá contribuir para esclarecer esta questão.

6 CONCLUSÃO

Registramos pela primeira vez a presença do nematódeo *Strongyluris* sp., infectando o molusco terrestre pulmonado *Megalobulimus elongatus* Bequaert, 1948 na localidade de Barra do Ribeiro, no Rio Grande do Sul.

Todos os animais infectados apresentaram larvas de terceiro estágio encistadas do nematódeo.

Este achado agrega mais uma informação sobre a biologia de um integrante da malacofauna do Rio Grande do Sul.

Contudo, cabe salientar que mais estudos devem ser realizados a respeito da malacofauna do estado, seja através de estudos ambientais, econômicos ou médicos e veterinários, tendo como objetivo conhecer e compreender estas espécies e suas interações.

7 PERSPECTIVAS

Concluir as análises histológicas a fim de se certificar da existência ou não de helmintos microscópicos e/ou de outros estágios larvais de *Strongyluris*, bem como verificar possíveis alterações nos tecidos dos animais infectados.

Verificar possíveis alterações neuroquímicas no sistema nervoso, tanto em neurônios como em células gliais nos animais infectados.

Estudar a importância do *Megalobulimus elongatus* como possível hospedeiro intermediário na cadeia alimentar de hospedeiro(s) definitivo(s) do nematódeo no município de Barra do Ribeiro, RS.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUDO-PADRÓN, A. I. (2009). Recent terrestrial and freshwater molluscs of Rio Grande do Sul State, RS, Southern Brazil Region: a comprehensive synthesis and check list. *Visaya Agosto*, 2-14.
- AGUDO-PADRÓN, A. I. (2012). Dangerous Brazilian environmental controversies y involving exotic and native land snails. *International Journal of Biology and Biological Sciences*, 1(1), 1-4.
- AMAYA, I. (2014). Enteroparásitos de interés médico en ejemplares de *Achatina fulica* capturados en Ciudad Bolívar, estado Bolívar, Venezuela. (INCOMPLETA)
- ANDERSON, R. C., CHABAUD, A. G., & WILLMOTT, S. (Eds.). (2009). *Keys to the nematode parasites of vertebrates: archival volume*. CABI. Pg 298.
- ASH RL. (1970) Diagnostic morphology of the third-stage larvae of *Angiostrongylus cantonensis*, *Angiostrongylus vasorum*, *Angiostrongylus abstrusus* and *Anafilaroides rostratus* (Nematoda: Metastrongyloidea). *J Invertebr Pathol* 56: 249-253.
- AYALA, M. A. R. (1987). Angiostrongiloidíase abdominal: seis casos observados no Paraná e em Santa Catarina, Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 82, 29-36.
- BAIN O. (1970) Cycle evolutif de l'Heterakidae *Strongyluris brevicaudata* (Nematoda). *Ann Parasit* 45: 637-653.
- BARBOSA, C. S., BARBOSA, V. S., MELO, F. L. D., MELO, M. S. B. D., BEZERRA, L., CAMPOS, J. V. & DOMINGUES, A. L. (2013). Autochthonous cases of schistosomiasis in children in Recife, Northeastern Brazil. *Revista de Saúde Pública*, 47(4), 684-690.
- BRUSCA, R. C., & BRUSCA, G. J. (2007). *Invertebrados*. 2ª edição. Editora Guanabara. Pg. 373, 731-738.
- COLLEY & FISCHER 2009...
- CHABAUD, A. G. (1971). Evolution of host-parasite adaptation in nematodes of vertebrates. *International journal for parasitology*, 1(3), 217-221.
- DE OLIVEIRA, A. P. M., TORRES, E. J. L., MALDONADO JR, A., DE BARROS ARAÚJO, J. L., FERNANDEZ, M. A., & THIENGO, S. C. (2010). *Achatina*

- fulica* como hospedeiro intermediário de nematódeos de interesse médico-veterinário em goiás, brasiL. *Revista de Patologia Tropical*, 39(3), 199-210.
- DE FRAGA, L. S. ; DA SILVA, R.S.M. ; ACHAVAL, M. ; ZANCAN, D.M. (2004). Carbohydrate metabolism in the central nervous system of the *Megalobulimus oblongus* snail during anoxia exposure and post-anoxia recovery. *Journal of Experimental Zoology. Part A, Comparative Experimental Biology* , v. 301A, p. 968-978.
- DE FRAGA, L.S.; DA SILVA, R.S.M.; ZANCAN, D.M. (2010). Control of carbohydrate metabolism in an anoxia-tolerant nervous system. *J. Exp. Zool.* 313A:539–547
- DI CESARE, A., CRISI, P. E., BARTOLINI, R., IORIO, R., TALONE, T., FILIPPI, L., & TRAVERSA, D. (2015). Larval development of *Angiostrongylus vasorum* in the land snail *Helix aspersa*. *Parasitology Research*, 114(10), 3649-3655.
- FONTENELLI, J.H. 2012. Anatomia, taxonomia, e distribuição geográfica dos caracóis-gigantes do “complexo *Megalobulimus granulatus*” (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata). 2012. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, Brasil.
- FORD, S. E., KANALEY, S. A., & LITTLEWOOD, D. T. J. (1993). Cellular responses of oysters infected with *Haplosporidium nelsoni*: changes in circulating and tissue-infiltrating hemocytes. *Journal of invertebrate pathology*, 61(1), 49-57.
- FORTES, E. (2004). *Parasitologia veterinária*. 4ª edição. Editora ícone. Pg.
- GRAEFF-TEIXEIRA, C., THIENGO, S. C., THOME, J. W., MEDEIROS, A. B., CAMILLO-COURA, L., & AGOSTINI, A. A. (1993). On the diversity of mollusc intermediate hosts of *Angiostrongylus costaricensis* Morera & Céspedes, 1971 in southern Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 88(3), 487-489
- JAEGER, C.P. 1961. Physiology of mollusca. I. Action of acetylcholine on the heart of *Strophocheilus oblongus*. *Comp Biochem Physiol.* 4:30-2.
- LUTZ (1921) Observações sobre o gênero *Urogonimus* e uma nova forma de *Leucochloridium* em novo hospedeiro. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 13: 136-140., apud Barbosa, F. S. (1995). *Tópicos em malacologia médica*. SciELO- Editora FIOCRUZ. Pg. 43
- KALIL-GASPAR, P., MARCUZZO, S., RIGON, P., MOLINA, C. G., & ACHAVAL, M. (2007). Capsaicin-induced avoidance behavior in the terrestrial Gastropoda *Megalobulimus abbreviatus*: evidence for TRPV-1 signaling and opioid

- modulation in response to chemical noxious stimuli. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 148(2), 286-291.
- KLIKS, M. M., & PALUMBO, N. E. (1992). Eosinophilic meningitis beyond the Pacific Basin: the global dispersal of a peridomestic zoonosis caused by *Angiostrongylus cantonensis*, the nematode lungworm of rats. *Social science & medicine*, 34(2), 199-212.
- LIMA, L. C., MASSARA, C. L., SOUZA, C. P. D., VIDIGAL, T. D., LENZI, H. L., & CARVALHO, O. D. S. (1992). Susceptibility of planorbids from the metropolitan region of Belo Horizonte, MG (Brazil) to *Angiostrongylus costaricensis* (Nematoda, Angiostrongylidae). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 34(5), 399-402.
- LUKA, J., & MBAYA, A. W. (2015). Cercarial shedding of trematodes and their associated snail intermediate hosts in Borno State, Nigeria. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 5(4), 293-298.
- MALDONADO JÚNIOR, A., SIMÕES, R. O., OLIVEIRA, A. P. M., MOTTA, E. M., FERNANDEZ, M. A., PEREIRA, Z. M. & THIENGO, S. C. (2010). First report of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongylidae) in *Achatina fulica* (Mollusca: Gastropoda) from Southeast and South Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105(7), 938-941.
- MCCARTHY H.O.M., FITZPATRICK S.M., IRWIN. S.W.B. (2004). Parasite alteration of host shape: a quantitative approach to gigantism helps elucidate evolutionary advantages. *Parasitology*, 128, 7–14.
- MONÉ Y., RIBOU AC, COSSEAU C, DUVAL D, THÉRON A, MITTA G, GOURBAL B. (2011). An example of molecular co-evolution: reactive oxygen species (ROS) and ROS scavenger levels in *Schistosoma mansoni*/*Biomphalaria glabrata* interactions. *Int J Parasitol.*;41(7):721-30.
- MOURITSEN K.M. & POULIN R. (2003). Parasite-induced trophic facilitation exploited by a non-host predator: a manipulator's nightmare. *Int. J. Parasitology*, 33: 1043–1050.
- REY, L. (2001). *Parasitologia*. 4ª. Edição Editora Guanabara Koogan. Pg. 89- 90.
- RIGON, P., DE CASTILHOS, J., MOLINA, C. G., ZANCAN, D. M., & ACHAVAL, M. (2010). Distribution of NADPH-diaphorase activity in the central nervous system of the young and adult land snail *Megalobulimus abbreviatus*. *Tissue and Cell*, 42(5), 307-313.

- ROHR, R. A., & AMATO, S. B. (2014). Hemocytes of *Bradybaena similaris* and *Megalobulimus abbreviatus* (Gastropoda, Stylommatophora). *Iheringia. Série Zoologia*, 104(2), 209-215.
- (Síntese apresentada pelo grupo temático da fauna em 2010)
- O Grupo Temático da Fauna foi coordenado pela pesquisadora Georgina Bond Backup, professora colaboradora do Departamento de Zoologia da UFRGS e membro da ONG IGRE. Site: <http://www.ecologia.ufrgs.br/biofronteiras/invertebrados.htm> (data do acesso: 14/11/2015)
- SWAROWSKY, A., MONTEIRO, A. F., XAVIER, L. L., ZANCAN, D. M., & ACHAVAL, M. (2005). Serotonergic immunoreactivity in the pedal ganglia of the pulmonate snail *Megalobulimus abbreviatus* after thermal stimulus: a semi-quantitative analysis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 141(2), 230-238.
- THIENGO, S. C. (1995). Presence of *Strongyluris*-like larvae (nematoda) in some terrestrial molluscs in Brazil.
- THIENGO, S. C., FARACO, F. A., SALGADO, N. C., COWIE, R. H., & FERNANDEZ, M. A. (2007). Rapid spread of an invasive snail in South America: the giant African snail, *Achatina fulica*, in Brasil. *Biological Invasions*, 9(6), 693-702.
- THIENGO, S. C., FERNANDEZ, M. A., TORRES, E. J., COELHO, P. M., & LANFREDI, R. M. (2008). First record of a nematode *Metastrongyloidea* (*Aelurostrongylus abstrusus* larvae) in *Achatina* (*Lissachatina*) *fulica* (*Mollusca*, *Achatinidae*) in Brazil. *Journal of invertebrate pathology*, 98(1), 34-39.
- THIENGO, S. C., BARBOSA, A. F., COELHO, P. M., & FERNANDEZ, M. A. (2005). Moluscos exóticos com importância médica no Brasil. *Brasília, I Simpósio Brasileiro Sobre Espécies Exóticas Invasoras*. Available online at: <http://www.mma.gov.br/invasoras> [Accessed: 20/1/2008].
- TUNHOLI-ALVES, V. M.; TUNHOLI, V. M.; PINHEIRO, J.; THIENGO, S. C. (2013). Effects of infection by larvae of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda, Metastrongylidae) on the metabolism of the experimental intermediate host *Biomphalaria glabrata*. *Parasitol Res* 112:2111–2116.
- TUNHOLI, V. M.; MONTEIRO, C. O.; DA SILVA, L. C.; DOLINSKI, C. DE M.; DOS SANTOS, M. A. J.; RODRIGUES, M. DE L. DE A; BITTENCOURT, V. R. E. P.; PINHEIRO, J.; TUNHOLI-ALVES, V. M. (2014). Physiological

- alterations in *Bradybaena similaris* (Stylommatophora: Bradybaenidae) induced by the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis indica* (Rhabditida: Heterorhabditidae) strain LPP1. *Experimental Parasitology* 139: 12–18.
- TUNHOLI-ALVES, V. M. TUNHOLI, V. M.; CASTRO, R. N.; SANT'ANA, L. D.; SANTOS-AMARAL, L.; DE OLIVEIRA, A. P. M.; GARCIA, J., THIENGO, S. C.; PINHEIRO, J.; MALDONADO JR, A. (2014). Activation of anaerobic metabolism in *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Gastropoda) experimentally infected by *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda, Metastrongylidae) by high-performance liquid chromatography. *Parasitology International* 63: 64–68
- VASCONCELOS, C. H.; CARDOSO, P. C. M.; QUIRINO, W. C.; MASSARA, C. L.; AMARAL, G. L.; CORDEIRO, R., & DOS SANTOS CARVALHO, O. (2009). Avaliação de medidas de controle da esquistossomose mansoni no Município de Sabará, Minas Gerais, Brasil, 1980-2007 Evaluation of schistosomiasis mansoni control measures in Sabará, Minas Gerais State, Brazil. *Cad. saúde pública*, 25(5), 997-1006.
- VINCENTE, J. J.; RODRIGUES, H. O.; GOMES, D. C. & PINTO, R. M. (1993). Nematóides do Brasil. Parte III: Nematóides de Répteis. *Revta bras. Zool.* 10 (1): 19-168.
- WOODRUFF, D. S., & UPATHAM, E. S. (1993). Snail-transmitted diseases of medical and veterinary importance in Thailand and the Mekong valley. *Journal of Medical and Applied Malacology*, 4, 1-12.
- MARTINEZ-PEREIRA, M.A; FRANCESCHI, R C; ANTUNES, G F; COELHO BP, ACHAVAL, M.; AND ZANCAN, D.M. (2013). General Morphology and Innervation of the Midgut and Hindgut of *Megalobulimus ABBREVIATUS* (Gastropoda, Pulmonata). *Zoological Science* 30: 319–330
- ZANCAN, D. M.; BRAUER, M.; ACAVAL, M. (1997). Monoamine-containing neurons in the central nervous system of *Megalobulimus oblongus* (Gastropoda, Pulmonata). *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. No. 3, pp. 765-772.
- ZANOL, J., FERNANDEZ, M. A., OLIVEIRA, A. P. M. D., RUSSO, C. A. D. M., & THIENGO, S. C. (2010). O caramujo exótico invasor *Achatina fulica* (Stylommatophora, Mollusca) no Estado do Rio de Janeiro (Brasil): situação atual. *Biota Neotrop*, 10, 447-451.

