

## ENTENDENDO A INTERAÇÃO BIOLÓGICA ENTRE DUAS ESPÉCIES INVASORAS: INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE *Melanoïdes tuberculata* (MOLLUSCA: THIARIDAE) POR *Centrocestus formosanus* (TREMATODA: HETEROPHYIDAE)

Nicole Q. Gonçalves<sup>1</sup>, Danimar López<sup>2</sup>, Eduardo A. Pulido-Murillo<sup>2</sup>, Alan L. Melo<sup>3</sup>, Hudson A. Pinto<sup>4</sup>

1. Estudante de Iniciação Científica, ICB, UFMG
2. Estudante do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, ICB, UFMG
3. Professor, Departamento de Parasitologia, ICB, UFMG
4. Professor, Departamento de Parasitologia, ICB, UFMG / Orientador

### Resumo:

*Melanoïdes tuberculata* é um molusco aquático invasor que está envolvido na transmissão de parasitos no Brasil. Entre estes encontra-se *Centrocestus formosanus*, trematódeo intestinal de aves e mamíferos (incluindo humanos), com aspectos biológicos de sua fase de desenvolvimento em *M. tuberculata* ainda desconhecidos. No presente estudo, parasitos adultos obtidos experimentalmente em roedores foram mantidos em água para o acompanhamento do desenvolvimento de ovos. Verificou-se a formação de miracídios, mas não sua eclosão, a partir de 14 dias de incubação. Parasitos contendo ovos larvados foram colocados em contato com exemplares de *M. tuberculata* mantidos em laboratório, sendo o sucesso da infecção avaliado pela liberação de cercárias a partir de 84 dias. Os resultados obtidos revelam pela primeira vez que no ciclo biológico de *C. formosanus*, a infecção dos moluscos ocorre passivamente pela ingestão de ovos, que é seguida de uma longa fase de desenvolvimento no hospedeiro intermediário.

**Autorização legal:** CEUA (20/2016).

**Palavras-chave:** ciclo biológico, espécies invasoras, trematódeos.

**Apoio financeiro:** FAPEMIG.

### Introdução:

*Melanoïdes tuberculata* (Müller, 1774) é um molusco tiarídeo originário da Ásia que foi introduzido no continente americano na década de 1960 e atualmente adquiriu o *status* de espécie invasora em diversos países, inclusive no Brasil (Fernandez *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2012). A presença destes moluscos nas coleções aquáticas em que foram introduzidos está associada a potenciais impactos

ecológicos, como a competição com espécies nativas de moluscos bem como a manutenção de parasitos de importância médica e veterinária (Santos *et al.*, 2012). Do ponto de vista parasitológico, quatro espécies de trematódeos foram até o momento relatadas infectando *M. tuberculata* no continente americano: *Centrocestus formosanus* (Nishigori, 1924), *Philophthalmus gralli* Mathis & Leger, 1910, *Renicola* sp. e *Haplorchis pumilio* (Looss, 1896). Destas, apenas *H. pumilio* ainda não foi identificada em *M. tuberculata* no Brasil (Pinto & Melo, 2010a, b, 2011, 2012a; Paula-Andrade *et al.*, 2012; Ximenes *et al.*, 2016).

Entre estas espécies de trematódeos invasores, *C. formosanus* é a que apresenta maior número de registros no Novo Mundo, e mesmo no Brasil. Este trematódeo pertence à família Heterophyidae e infecta aves e mamíferos, já tendo sido relatado em seres humanos na Ásia (Sholz & Salgado-Maldonado, 2000; Chai *et al.*, 2013). O ciclo biológico deste trematódeo é complexo, possuindo, além de *M. tuberculata* como primeiro hospedeiro intermediário, peixes como segundos hospedeiros intermediários (Sholz & Salgado-Maldonado, 2000). Nestes vertebrados aquáticos, metacercárias formadas nas brânquias podem ocasionar mortalidade e atraso de desenvolvimento, resultando em potenciais prejuízos à piscicultura (Mitchell *et al.*, 2005). De fato, dezenas de espécies de peixes foram relatadas naturalmente infectadas por *C. formosanus* na Ásia e Américas, incluindo alguns registros recentes no Brasil (Chen, 1942; Sholz & Salgado-Maldonado, 2000; Han *et al.*, 2008; Pinto & Melo, 2012b).

Apesar do envolvimento de *M. tuberculata* na transmissão de *C. formosanus* ter sido verificado em diferentes partes do mundo, aspectos da interação parasito-hospedeiro, em especial o mecanismo de infecção e o tempo de desenvolvimento deste heterofídeo em seu molusco transmissor, são desconhecidos. Tais informações podem

permitir a compreensão de aspectos biológicos deste parasito, podendo subsidiar futuras estratégias de controle.

No presente estudo avaliou-se a infecção experimental de *M. tuberculata* por *C. formosanus*.

### Metodologia:

Ensaio experimentais visando a manutenção do ciclo biológico de *C. formosanus* em condições de laboratório foram iniciados a partir de exemplares de *M. tuberculata* naturalmente infectados por larvas de trematódeos. Cercárias emergidas destes moluscos após fotoestimulação artificial foram utilizadas para a infecção de 30 exemplares de *Poecilia reticulata* (Peters, 1859), peixe de pequeno tamanho criado em laboratório. Cada peixe recebeu cerca de 300 cercárias. Trinta dias após infecção (DPI), os animais foram eutanasiados por superdosagem de anestésico e os arcos e filamentos branquiais foram removidos e examinados em microscópio de luz para a pesquisa e contagem das metacercárias. Fragmentos das brânquias contendo as formas parasitárias foram administradas por via oral a 6 camundongos Swiss (200 metacercárias/animal). Visando aumentar o número de parasitos recuperados, os roedores receberam diariamente fosfato sódico de dexametasona (50 mg/kg) por 12 dias, quando os animais foram eutanasiados e parasitos adultos recuperados no terço proximal do intestino delgado. Uma amostra dos helmintos obtidos foi devidamente fixada e processada para a identificação taxonômica por abordagem morfológica (estudo em microscópio de luz) e molecular (amplificação por PCR e sequenciamento de regiões parciais dos genes ribossomais ITS-2 e 18S).

Visando avaliar o desenvolvimento de miracídios nos ovos, parte dos parasitos recuperados foram transferidos para microtubos contendo água destilada, o que ocasionou a morte dos parasitos, mas não interferiu na viabilidade dos ovos. Amostras dos parasitos foram examinadas em microscópio de luz duas vezes por semana por 1 mês para a avaliação do desenvolvimento e viabilidade (movimentação) dos miracídios.

Após o período de incubação, os parasitos contendo ovos com miracídio formado foram utilizados para a infecção de *M. tuberculata* (48 exemplares medindo 7-10 mm de comprimento e negativos para a infecção por trematódeos). Os moluscos foram transferidos individualmente para placas de poliestireno de 24 poços contendo cerca de 2 ml de água isenta de cloro e 1 exemplar de parasito contendo

ovos maduros. Após cerca de 1h, as placas foram avaliadas em estereomicroscópio quando a presença de parasitos. Em seguida, os moluscos foram transferidos para aquário contendo 1L de água (renovada semanalmente) e alimentados com folhas de alface. Um grupo de *M. tuberculata* não infectado foi mantido como controle. A mortalidade dos moluscos e o sucesso de infecção foram avaliados semanalmente a partir de 30 DPI, sendo este último parâmetro verificado pelo teste de fotoestimulação artificial. Aos 90 DPI, os moluscos negativos para emergência de cercárias foram prensados entre placas de vidro para a pesquisa de estágios intramolusco (rédias).

### Resultados e Discussão:

A morfologia das metacercárias obtidas em *P. reticulata* e dos parasitos adultos recuperados experimentalmente em camundongos revelaram que a cercária utilizada nos ensaios experimentais correspondem a *C. formosanus*. Esta informação foi corroborada por dados moleculares, que revelaram, para ambos os marcadores ribossomais utilizados [ITS-2 (296pb) e 18S (560pb)], 99-100% de similaridade com isolados de *C. formosanus* oriundos da América do Norte e Ásia.

Verificou-se que a incubação de parasitos adultos em água destilada possibilita a formação de miracídios nos ovos intrauterinos. Inicialmente imaturo, tal como eliminado nas fezes do hospedeiro definitivo, foi observado a formação do miracídio a partir do 12º dia de incubação. Além disso, não se observou a eclosão dos miracídios por um período de até 30 dias de incubação.

No presente estudo, a infecção experimental de *M. tuberculata* por *C. formosanus* foi realizado com sucesso pela primeira vez, revelando que no ciclo biológico deste parasito, a infecção do molusco ocorre pela ingestão de ovos contendo miracídio. Cercárias de *C. formosanus* foram obtidas de *M. tuberculata* experimentalmente infectados a partir 84 DPI. Dos 48 exemplares infectados, 33 (69%) sobreviveram até este período. Destes, 7 (21%) eliminaram cercárias após fotoestimulação e outros 21 (63%) apresentaram-se positivos para cercárias e/ou rédias após esmagamento. A taxa de infecção experimental, considerando-se os dois métodos de análise foi de 85%, revelando que a suscetibilidade de *M. tuberculata* a *C. formosanus* é elevada.

Os resultados obtidos complementam estudos clássicos sobre o ciclo de vida de *C.*

*formosanus*, elucidado de forma parcial na Ásia (Chen, 1942, 1948). Assim, o ciclo biológico de *C. formosanus*, aqui elucidado de forma completa em condições experimentais, pode ser realizado em aproximadamente 4 meses. As informações biológicas obtidas contribuem para o conhecimento da interação entre estes invertebrados invasores e podem ser importantes para direcionar estratégias de controle.

### Conclusões:

A infecção de *M. tuberculata* por *C. formosanus* ocorre de forma passiva pela ingestão de ovos contendo miracídios obtidos após incubação dos ovos. Além disso, este tiarídeo se demonstrou altamente suscetível a infecção experimental pelo parasito. Por fim, a fase de desenvolvimento intramolusco de *C. formosanus*, que resulta na eliminação de cercárias, dura cerca de 90 dias.

### Referências bibliográficas

Chai JY, Sohn WM, Yong TS, Eom KS, Min DY, Lee MY, Lim H, Insisiengmay B, Phommasack B, Rim HJ (2013). *Centrocestus formosanus* (Heterophyidae): human infections and the infection source in Lao PDR. *J Parasitology* 99: 531-536.

Chen HT (1942). The metacercaria and adult of *Centrocestus formosanus* (Nishigori, 1924) with notes on the natural infection of rats and cats with *C. armatus* (Tanabe, 1922). *J Parasitol* 28: 285-298.

Chen HT (1948). Some early larval stages of *Centrocestus formosanus* (Nishigori, 1924). *Lingnan Sci J* 22: 93-105.

Fernandez MA, Thiengo SC, Simone LRL (2003). Distribution of the introduced freshwater snail *Melanooides tuberculatus* (Gastropoda: Thiaridae) in Brazil. *Nautilus* 117: 78-82.

Han ET, Shin EH, Phommakorn S, Sengvilaykham B, Kim JL, Rim HJ (2008). *Centrocestus formosanus* (Digenea: Heterophyidae) encysted in the freshwater fish, *Puntius brevis*, from Lao PDR. *Korean J Parasitol* 46: 49-53.

Mitchell AJ, Overstreet RM, Goodwin AE, Brandt TM (2005). Spread of an exotic fish-gill trematode: a far-reaching and complex problem. *Fisheries* 30: 11-16.

Paula-Andrade C, Pinto HA, Coscarelli D,

Vidigal THDA, Melo AL (2012). The natural infection of *Melanooides tuberculata* (Müller, 1774) (Mollusca: Gastropoda) by *Centrocestus formosanus* (Nishigori, 1924) (Platyhelminthes: Trematoda) in Paranoá lake, Brasília, Brazil. *Braz J Biol* 72: 419-420.

Pinto HA, Melo AL (2010a). *Melanooides tuberculata* (Mollusca: Thiaridae) as an intermediate host of *Centrocestus formosanus* (Trematoda: Heterophyidae) in Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 52: 207-210.

Pinto HA, Melo AL (2010b). *Melanooides tuberculata* as intermediate host of *Philophthalmus gralli* in Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 52: 323-327.

Pinto HA, Melo AL (2011). A checklist of trematodes (Platyhelminthes) transmitted by *Melanooides tuberculata* (Mollusca: Thiaridae). *Zootaxa* 2799: 15-28.

Pinto HA, Melo AL (2012a). *Melanooides tuberculata* (Mollusca: Thiaridae) harboring renicolid cercariae (Trematoda: Rencolidae) in Brazil. *J Parasitol* 98: 784-787.

Pinto HA, Melo AL (2012b). Metacercariae of *Centrocestus formosanus* (Trematoda: Heterophyidae) in *Australoheros facetus* (Pisces: Cichlidae) in Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 21: 334-337.

Santos SB, Thiengo SC, Fernandez MA, Miyahira IC, Gonçalves ICB, Ximenes RF, Mansur MCD, Pereira D (2012). Espécies de moluscos límnicos invasores no Brasil. In: Mansur, MCD et al. Moluscos límnicos invasores no Brasil: biologia, prevenção, controle. Porto Alegre. Redes Editora 25-49.

Scholz T, Salgado-Maldonado G (2000). The introduction and dispersal of *Centrocestus formosanus* (Nishigori, 1924) (Digenea: Heterophyidae) in Mexico: a review. *Am Mid Nat* 143: 185-200.

Ximenes RF, Gonçalves ICB, Miyahira IC, Pinto HA, Melo AL, Santos SB (2016). *Centrocestus formosanus* (Trematoda: Heterophyidae) in *Melanooides tuberculata* (Gastropoda: Thiaridae) from Vila do Abraão, Ilha Grande, Rio de Janeiro, Brazil. *Braz J Biol* (In press).