

Susceptibilidade de embriões de *Biomphalaria tenagophila* (mollusca: gastropoda) a infecção por *Pochonia chlamydosporia* (ascomycota: sordariomycetes): uma perspectiva para o controle da esquistossomose mansônica

Victor Menezes Tunholi¹, Sara Avelino Braga Sarte², Raissa de Oliveira Curty², Mônica Mello de Azevedo², Lorena Souza Castro³, Isabella Vilhena Freire-Martins⁴, Vinícius Menezes Tunholi-Alves⁵, Ludimila Santos Amaral⁶, Jairo Pinheiro⁵

Submissão: 10/02/2023

Aprovação: 20/05/2023

Resumo: O trematódeo *Schistosoma mansoni* é um parasito heteroxeno obrigatório, demonstrando em seu ciclo de vida a participação de hospedeiros definitivos e intermediários. A fase de desenvolvimento larval se realiza em moluscos aquáticos do gênero *Biomphalaria*, formando as cercárias, que emergem para infectar um hospedeiro vertebrado final. Essa fase inicial é essencial para a multiplicação do parasito. Assim, estudos de controle de doenças causadas por trematódeos digenéticos focam no combate de moluscos hospedeiros. O objetivo do estudo foi avaliar a suscetibilidade de embriões de *B. tenagophila* ao fungo *Pochonia chlamydosporia*, isolado Pc-10, sob condições laboratoriais. Para isso, dois grupos experimentais foram formados: o grupo controle, sem o fungo, e o grupo tratado, referente a exposição das massas ovíferas do hospedeiro aos propágulos do isolado (Pc-10). O experimento foi conduzido em duplicata, constando de cinco réplicas para cada repetição (cinco massas ovíferas), utilizando N total de 100 massas ovíferas. A exposição aos corpos hifais de Pc-10 comprometeu significativamente a viabilidade dos ovos de *B. tenagophila*, inibindo em cerca de 83,7% a embriogênese em relação ao grupo controle. As análises de microscopia eletrônica de transmissão e varredura revelaram alterações estruturais relevantes nas membranas de revestimento embrionário em massas ovíferas expostas à ação micelial do fungo, interferindo no desenvolvimento e eclosão do planorbídeo em questão. Esses resultados ratificam a suscetibilidade de embriões de *B. tenagophila* ao fungo *P. chlamydosporia*, isolado Pc-10, sugerindo sua utilização em programas oficiais de controle da esquistossomose mansônica.

Palavras-chave: *Schistosoma mansoni*. Fungo. Controle microbiano. Hospedeiro intermediário.

Susceptibility of embryos of *Biomphalaria tenagophila* (mollusca: gastropoda) to infection by *Pochonia chlamydosporia* (ascomycota: sordariomycetes): a perspective for the control of mansonic schistosomiasis

Abstract: The trematode *Schistosoma mansoni* is a heteroxenous parasite, depending in its life cycle on the participation of obligatory intermediate and definitive hosts. The larval development occurs in aquatic molluscs the *Biomphalaria* genus, forming of cercariae, which emerge to infect the final vertebrate host. This initial stage is essential for the parasite's multiplication. Thus, studies for control of the diseases caused by digenetic trematodes often focus on combating the snail hosts. The objective of this study was to evaluate the susceptibility of *B. tenagophila* embryos to the fungus *Pochonia chlamydosporia* (isolate Pc-10) under laboratory conditions. Two experimental groups were formed: the control group, without exposure to the fungus; and the treated group, in which the snail egg masses were exposed to propagules of the fungal isolate (Pc-10). The entire experiment was conducted in duplicate, with five replicates for each repetition (five egg masses), utilizing a total of 100 egg masses. The exposure to the fungal hyphal bodies significantly impaired the viability of the *B. tenagophila* eggs, inhibiting the embryogenesis by 83.7% in relation to the control group. Transmission and scanning electron microscopic images revealed relevant structural alterations in the embryonic membranes of egg masses exposed to the mycelial action of the fungus, interfering in the development and hatching of the planorbid under analysis. These results indicate the susceptibility of *B. tenagophila* embryos to the fungus *P. Chlamydosporia* (isolate Pc-10), suggesting the possibility of using them in programs to control mansonic schistosomiasis.

Keywords: *Schistosoma mansoni*. Fungus. Microbial control. Intermediate host.

¹ Doutor em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal Rural de Rio de Janeiro (UFRRJ). Professor da Faculdade Multivix - Cachoeiro de Itapemirim, Cachoeiro de Itapemirim, ES, Brasil. victortunholi@gmail.com

² Graduandas em Biomedicina da Faculdade Multivix - Cachoeiro de Itapemirim, Cachoeiro de Itapemirim, ES, Brasil.

³ Mestre em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Av. P H Rolfs s/n, Viçosa, MG, Brasil.

⁴ Doutora em Ciências Veterinárias pela UFRRJ. Departamento de Medicina Veterinária, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo-UFES, Alegre, ES, Brasil.

⁵ Doutor em Ciências Veterinárias pela UFRRJ. Instituto de Veterinária (IV), Departamento de Parasitologia Animal (DPA), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil.

⁶ Doutora em Ciências Veterinárias pela UFRRJ. Instituto de Veterinária (IV), Departamento de Parasitologia Animal (DPA), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil

INTRODUÇÃO

A esquistossomose mansônica, enfermidade popularmente conhecida como “barriga d’água”, “mal-do-caramujo” ou “xistose”, mostra-se endêmica no Brasil, apresentando como agente etiológico o trematódeo *Schistosoma mansoni* (BRASIL, 2010). Trata-se de uma doença infecto-parasitária, com notória relevância em saúde pública, de caráter agudo e crônico, cujas manifestações clínicas variam desde uma dermatite leve até alterações hepatoesplênicas relevantes caracterizadas por hepatopatias com fibrose periportal, hipertensão portal, esplenomegalia e ascite (BEZERRA et al., 2004; LAMBERTON et al., 2014). Segundo relatórios epidemiológicos apresentados por órgãos oficiais, a esquistossomíase afeta mais de 200 milhões de pessoas no mundo (WHO, 2009), e entorno de 2,5 a 8 milhões de brasileiros (BRASIL, 2014).

Vários são os fatores que contribuem para o estabelecimento e dispersão da esquistossomose mansônica no Brasil, tais como: a grande dispersão dos caramujos que atuam como hospedeiros intermediários do helminto em questão: *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila*; os movimentos migratórios, de caráter transitório ou permanente, de pessoas oriundas das áreas endêmicas; a deficiência de saneamento domiciliar e ambiental; e a carência de educação em saúde das populações sob risco de infecção (PASSOS; AMARAL, 1998; NACIFE et al., 2018). Assim, o controle dessa parasitose requer a adoção de medidas que vão desde a quimioterapia efetiva de hospedeiros definitivos infectados, a implementação de políticas públicas que visam a melhoria das condições sanitárias de regiões afetadas, educação sanitária da população-alvo e o controle populacional dos planorbídeos que integram a cadeia epidemiológica de transmissão da doença (WHO, 2009).

De acordo com a Organização das Nações Unidas (ONU), dentre as substâncias de ação moluscicida, a niclosamida se destaca (N-(2-cloro-4-nitrofenil)-5-clorosalicilanilida) (MACHADO, 1982; CANTANHEDE et al., 2010). Embora eficaz como agente moluscicida, a utilização dessa formulação mostra-se extremamente tóxica ao ambiente, à saúde humana e animal (HENRIOUD, 2011), não se apresentando segura. Em adição, estudos têm verificado que o uso desse produto por períodos prolongados favorece a seleção de moluscos resistentes, tornando-se inviável a sua utilização em programas oficiais de controle (ANDREWS et al., 1982).

Essa situação tem incentivado o desenvolvimento de métodos alternativos de controle, visando o molusco hospedeiro, baseados na adoção de substâncias biodegradáveis obtidas a partir de plantas (HARTMANN et al., 2011) ou através da associação com microrganismos patogênicos, como nematoides entomopatogênicos (TUNHOLI et al., 2017a, 2017b), bactérias (CHENG, 1986; SINGER et al., 1997) e fungos (DUARTE et al., 2015; CASTRO et al., 2019). Fungos são encontrados na natureza, desencadeando processos infecciosos em diferentes organismos, atuando como patógenos naturais, entretanto, nada é sabido sobre a patogenicidade destes em embriões de *B. tenagophila*.

Evidências iniciais sobre a susceptibilidade de *B. glabrata* a fungos patogênicos aquáticos e terrestres têm sido registrada por alguns autores (ROCHA et al., 2009; BARON et al., 2013). Em estudo experimental, Duarte et al. (2015) verificaram comprometimento da viabilidade de ovos de *B. glabrata* quando expostos a ação de conídios e corpos hifais de *Metarhizium anisopliae*. Observações adicionais revelaram potencial ovicida de *Pochonia chlamydosporia*, isolado Pc-10, sobre ovos de *Pseudosuccinea columella* (CASTRO et al., 2019). Para tais autores, *P. chlamydosporia* (Pc-10) induziu severas alterações estruturais nas massas ovíferas do limnédeo em questão, comprometendo, por conseguinte, o desenvolvimento e a eclodibilidade dos moluscos. Os resultados de ambos os estudos sugerem a utilização destas espécies de fungos em programas de controle biológico de moluscos hospedeiros. Apesar das informações acima relacionadas, a susceptibilidade de embriões de *B. tenagophila* ao fungo *P. chlamydosporia* ainda não foi caracterizada.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a susceptibilidade de embriões de *B. tenagophila* ao fungo *P. chlamydosporia*, isolado Pc-10, sob condições laboratoriais, como alternativa de controle da esquistossomose mansônica. Ademais, análises complementares de microscopia eletrônica de varredura e transmissão (MEV e MET) foram realizadas, possibilitando uma melhor compreensão dessa interface.

MATERIAS E MÉTODO

OBTENÇÃO DO FUNGO *POCHONIA CHLAMYDOSPORIA* (PC-10)

Para os ensaios laboratoriais realizados neste estudo, foi utilizado o isolado fúngico (Pc-10) de *P. chlamydosporia*. Este isolado foi obtido a partir da empresa Rizoflora®, situada na cidade de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. O isolado (Pc-10) foi cultivado em meio contendo ágar dextrose batata (BDA), durante sete dias em demanda bioquímica de oxigênio (BOD), modelo EL111/4, a 27°C e 80% de umidade relativa absoluta (URA) (CASTRO et al., 2019).

OBTENÇÃO DAS MASSAS OVÍGERAS DE BIOMPHALARIA TENAGOPHILA

Os espécimes de *B. tenagophila* foram coletados a partir de bebedouros de gado bovino e coleções hídras de curso lêntico localizados no município de Alegre (20° 45' 48" Sul, 41° 32' 2" Oeste), Espírito Santo, Brasil. No laboratório de parasitologia do hospital veterinário do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCA-E-Ufes), os moluscos (n = 180) foram mantidos em temperatura média de 24°C e acondicionados em aquários de vidro contendo previamente água desclorada com aeração artificial contínua. Tais organismos foram alimentados com folhas de alface (*Lactuca sativa*) ad libitum. Semanalmente, os aquários eram higienizados e as folhas de alface renovadas em dias alternados, evitando sua fermentação. Placas de poliestireno ($\pm 5 \text{ cm}^2$) foram colocadas no interior dos aquários para servirem como substratos para oviposição e obtenção das massas ovígeras.

EXPOSIÇÃO EXPERIMENTAL DAS MASSAS OVÍGERAS DE BIOMPHALARIA TENAGOPHILA AO FUNGO POCHONIA CHLAMYDOSPORIA (PC-10).

Um total de 120 massas ovígeras foram obtidas mediante posturas realizadas por *B. tenagophila* após 24 e 72 horas, sob condições laboratoriais. Estas foram analisadas com o auxílio de um microscópio estereoscópio para certificar a presença de ovos. Somente as massas ovígeras contendo embriões viáveis, em desenvolvimento, foram selecionadas para o ensaio experimental. Em seguida, as massas ovígeras (n = 100), apresentando cerca de 20 a 30 ovos, foram lavadas três vezes em água destilada e reservadas em tubos cônicos de centrifuga estéril (50 mL) contendo água destilada em temperatura ambiente até o início dos testes. Antes do início de cada ensaio, a viabilidade dos conídios (>95%) foi verificada conforme metodologia descrita por Duarte et al. (2015).

Para exposição experimental das massas ovígeras

(n = 5) aos corpos hifais do fungo, contendo aproximadamente 72×10^5 clamidósporos/mL do fungo, foram utilizadas placas de Petri (60 x 15 mm) portando um filme de água permanente sobre meio de ágar-água 2% (AA 2%). Estas placas foram inseridas no centro de outras placas de Petri maiores (80 x 15 mm), preenchidas com 2 mL de água destilada, a fim de manter a umidade e ambiente favorável para a embriogênese dos moluscos e germinação do fungo (CASTRO et al., 2019). Posteriormente, as placas de Petri (80 x 15 mm) foram seladas com Parafilm®, com o intuito de auxiliar a manutenção da umidade relativa, sendo em seguida incubadas em uma câmara escura a $23 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 15 dias.

Dois grupos experimentais foram edificados: o grupo controle, sem o fungo, e o grupo tratado, que evidenciou a exposição das massas ovígeras ao isolado (Pc-10). Todo o experimento foi conduzido em duplicata, constando de cinco réplicas para cada repetição (cinco massas ovígeras/réplica).

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET) E VARREDURA (MEV) DE MASSAS OVÍGERAS DE BIOMPHALARIA TENAGOPHILA EXPOSTAS E NÃO EXPOSTAS AO FUNGO POCHONIA CHLAMYDOSPORIA, ISOLADO PC-10.

Após 15 dias de incubação, as massas ovígeras (n = três massas ovígeras/grupo) de ambos os grupos experimentais (controle e tratado) foram fixadas em pino de microtubos (1,5 mL) contendo solução de glutaraldeído 2,5%. O processamento das amostras foi conduzido no Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins (LUCCAR), da Universidade Federal do Espírito Santo (Ufes).

A desidratação das amostras para a MEV foi realizada através das passagens seriadas em solução de álcool etílico em diferentes concentrações (30%, 50%, 70%, 90% e 100%) durante 10 minutos para cada concentração. Em seguida, o material foi seco em câmara de ponto crítico, utilizando CO2TOUSIMIS, Autosamdri® -815, aderido a um suporte metálico revestido com fita dupla face de carbono e coberto com uma camada de ouro de aproximadamente 250 Å, utilizando metalizador Denton Vacuum, DESK V. O material foi observado em microscópio eletrônico de varredura (JEOL-JEM 6610 LV, Inc. USA).

Para a MET, as amostras foram desidratadas mediante passagens em solução de acetona (50%, 70%, 90% e 100%), sendo realizada a inclusão gra-

dual em proporções crescentes de Epon: acetona, incluídas em resina epóxi EPON pura e levadas à estufa a 60°C, por 24 horas, até polimerização. Após a polimerização da resina, os blocos contendo as amostras foram seccionados em cortes ultrafinos de 60 nm de espessura em ultramicrotomo RMC Products, Power Tome X com faca de vidro, sendo coletados em grades de cobre (400 mesh) e contrastado em acetato de uranila 0,5% e citrato de chumbo (MACHADO; SOUZA, 1998) para visualização de estruturas biológicas. O material foi verificado em microscópio eletrônico de transmissão (JEOL-JEM 1400, Inc. USA).

TAXA DE ECLODIBILIDADE DE BIOMPHALARIA TENAGOPHILA EXPOSTOS A ATIVIDADE MICE-LIAL DE POCHONIA CHLAMYDOSPORIA (PC-10)

No final de 15 dias de incubação, as massas ovígeras de *B. Tenagophila* expostas e não expostas ao isolado Pc-10 foram analisadas, sob auxílio de um microscópio estereoscópico, para a contabilização dos moluscos eclodidos. A viabilidade foi considerada como a porcentagem de moluscoseclodidos em

relação ao número total de ovos depositados pelos moluscos de cada grupo experimental.

2.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram expressos como média \pm desvio - padrão pelo teste t de Student e submetidos aos testes de one-way Anova e Tukey–Kramer ($p < 0.001$) para a comparação das médias (GraphPadPrism Inc. 6.01, R 3.4.1).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após 15 dias de incubação, a exposição aos corpos hifais de *P. chlamydosporia*, isolado Pc-10, comprometeu diretamente o processo de embriogênese de *B. tenagophila*. Enquanto o grupo controle apresentou taxa de eclosão de 98% ($93,95 \pm 2,75$), as massas ovígeras expostas à ação micelial do isolado (Pc-10) demonstrou eclodibilidade de apenas 14,3% ($13,70 \pm 0,78$) (Figura 1). Estes resultados ratificam o potencial ovicida de Pc-10 sobre massas ovígeras de *B. tenagophila*, enquadrando como alternativa viável no controle da esquistossomose mansônica.

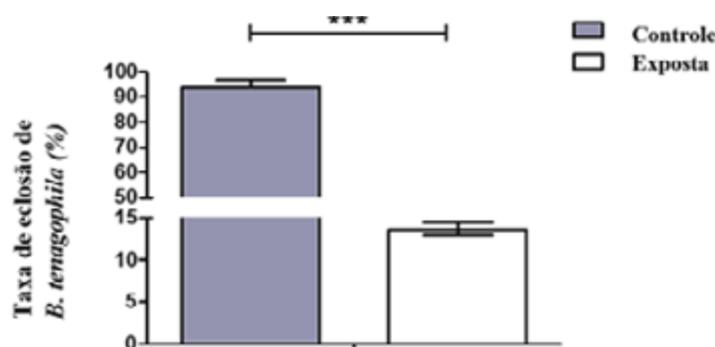


Figura 1. Eclodibilidade expressa em porcentagem (%) de Biomphalaria tenagophila exposta (tratada) e não exposta (controle) a propágulos do fungo Pochonia chlamydosporia isolado Pc-10. (***) As médias diferem significativamente entre si (média \pm DP). $P < 0.001$.

Fonte: Elaborada pelos autores, 2020.

A partir das análises de microscopia eletrônica de varredura e transmissão e de acordo com os parâmetros previamente estabelecidos por Lýsek e Stěrbá (1991), interações do tipo 1, caracterizadas por um efeito fisiológico e/ou bioquímico sem prejuízo morfológico à casca do ovo, onde hifas são observadas aderidas à superfície ovular; e do tipo 2, evidenciado pelo efeito lítico com alteração morfológica da casca do ovo e comprometimento no desenvolvimento embrionário, sem penetração hifal por meio da casca foram estabelecidas (Figura 2). O efeito do tipo 3, a qual relaciona com um efeito lítico acom-

panhado por alteração morfológica do embrião e da casca, otimizada mediante penetração de hifas e colonização interna do ovo, não foi evidenciado durante o período do estudo.

Em adição, as imagens ultraestruturais revelaram a presença de estruturas compatíveis ao clamidósporo e tubo germinativo aderidos à superfície da massa ovígera (Figuras 2H e I). Um emaranhado micelial, recobrendo externamente a massa ovígera, bem como a germinação de hifas para o seu interior, foram também caracterizadas (Figuras 2H e I).

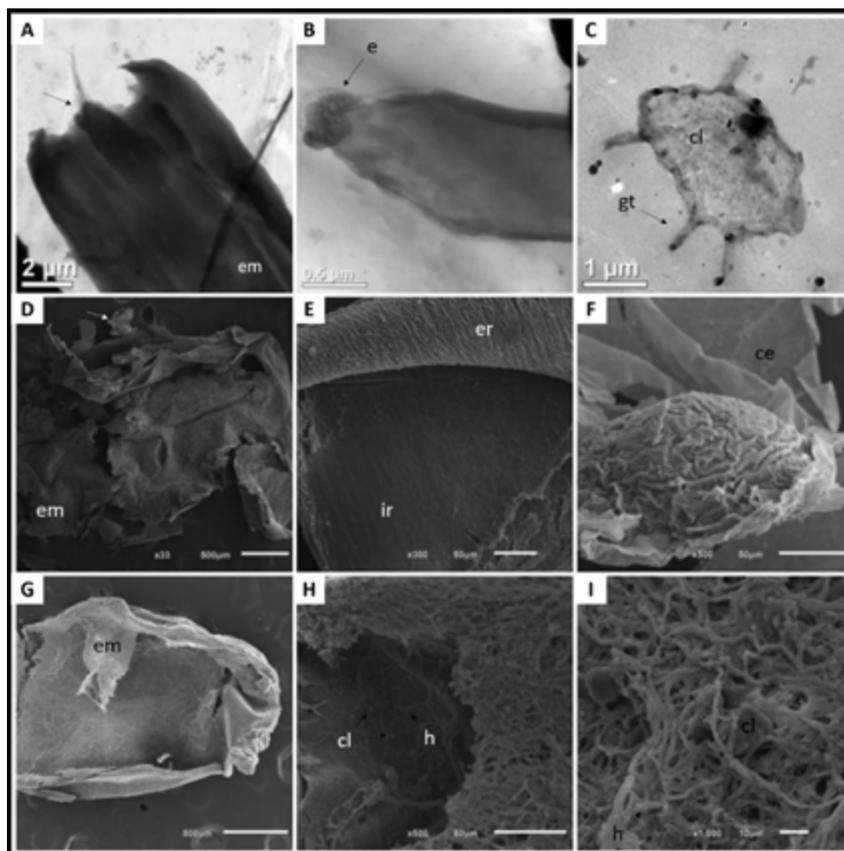


Figura 2. Microscopia eletrônica de transmissão de massa ovígera de *Biomphalaria tenagophila* exposta e não exposta aos propágulos de *Pochonia chlamydosporia* (isolado Pc-10) após 15 dias de incubação. No grupo controle (Fig. 2A), não houve evidências de estruturas germinativas do fungo, sendo observado apenas o rompimento da estrutura gelatinosa da massa ovígera (em), provavelmente mediante eclosão do molusco. No grupo tratado (Fig. 2B e C), foi possível observar a presença de um embrião (e) ainda em desenvolvimento na fase chamada de véliger (desenvolvimento da concha, olhos e pé), bem como a aderência de um clamidósporo (cl) e tubo germinativo (gt) sob a massa ovígera do planorbídeo (Fig. 2C). Microscopia eletrônica de varredura de massa ovígera de *Biomphalaria tenagophila* exposta e não exposta aos propágulos de *Pochonia chlamydosporia* (isolado Pc-10) após 15 dias de incubação. No grupo controle (Fig. 2D, E e F), a massa ovígera (em) apresentou rompida, não havendo evidências de estruturas germinativas do fungo na parte interna (ir) e externa (er) da estrutura, e um dos ovos com uma fina camada do tegumento (casca) rompido em decorrência a eclosão do planorbídeo (Fig. 2F). No grupo tratado, foi observado um emaranhado de micélio recobrendo a superfície externa dela (Fig. 2G, H e I), bem como a presença de clamidósporos (cl) e hifas (h) colonizando também internamente a massa ovígera do planorbídeo (Fig. 2H e I).

Fonte: Elaborada pelos autores, 2020.

Desde a década de 1950, estudos de controle biológico em moluscos hospedeiros têm sido realizados em substituição ao método químico, utilizando para tal propósito diferentes espécies de microrganismos considerados como “agentes controladores” para tais populações (BRASIL, 2008). Nesse contexto, Tunholi et al. (2017) observaram que a exposição experimental a juvenis infectantes de *H. baujardi* LPP7 induziu em *Lymnaea columella* castração parasitária e taxa de mortalidade de 66%. Por sua vez, Singer et al. (1997) verificaram sob condições laboratoriais o potencial moluscicida de *Bacillus* em *B. glabrata*, sugerindo sua utilização em programas de controle biológico da esquistossomose mansônica. Já Duarte et al. (2015) confirmaram a susceptibilidade de massas ovígeras de *B. glabrata* aos fungos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*.

No estudo, a exposição experimental aos corpos hifais de *P. chlamydosporia* (Pc-10) comprometeu em 83,7% a taxa de eclodibilidade de *B. tenagophila*. De modo geral, os fungos são agentes biológicos encontrados naturalmente em solos que sabidamente demonstram ação patogênica para várias espécies de invertebrados (ROCHA et al., 2009; BARON et al., 2013). Dentre as espécies de fungos utilizadas como agentes biocontroladores, *P. chlamydosporia* se destaca. Trata-se de um Ascomycota que possui distribuição mundial sendo isolado a partir de solos ricos em matéria orgânica (MANZANILLA-LOPEZ et al., 2013). Tal espécie é tida como um parasito facultativo de nematoides, ovos de moluscos e helmintos, bem como um hiperparasito de outros tipos de fungos, sendo por isso extensivamente utilizado no

controle de inúmeras parasitoses (ZARE et al., 2001; BRAGA; ARAÚJO, 2014).

Braga et al. (2008) têm avaliado in vitro efeito de *P. chlamydosporia* em ovos de *S. mansoni*. Segundo os autores, a exposição ao fungo comprometeu significativamente a viabilidade dos ovos do trematódeo em questão. Para Escudero et al. (2016), o potencial ovicida do Ascomycota decorre de uma ação mecânica imposta por seus corpos hifais durante etapa de germinação, associada à liberação de exoenzimas, como quitinases e proteases, que acabam por comprometer a superfície ovular, interferindo diretamente no estabelecimento do embrião. Dentre as proteases, a VCP1, uma serino-alcalina protease, se destaca por atuar na degradação da camada proteica que constitui a membrana externa dos ovos de helmintos (BRAGA et al., 2011). Nesse sentido, a interrupção do processo de embriogênese em *B. tenagophila* aqui verificada pode ter sido em consequência de interações similares desenvolvidas por hifas de *P. chlamydosporia*, isolado Pc-10, quando aderidas à superfície das massas ovíferas desse planorbídeo.

Recentemente, o efeito embriotóxico de *P. chlamydosporia*, isolado Pc-10, foi caracterizado em *Pseudosuccinea columella* (CASTRO et al., 2019). Utilizando de microscopia eletrônica de varredura e transmissão, os autores verificaram em decorrência ao crescimento micelial, importantes alterações nas membranas de revestimento dos embriões, contribuindo para a perda de água, eletrólitos, carboidratos, como o galactogênio, e outros nutrientes essenciais ao desenvolvimento embrionário do gastrópode (GOUDSMIT, 1972; FARO et al., 2013). Em adição, as massas ovíferas expostas à ação do fungo apresentaram-se aspecto seco e com sulcos profundos em sua superfície, promovidos provavelmente pelas demandas nutricionais do Ascomycota. Esse contexto contribuiu para a inibição de 93,15% da embriogênese desse hospedeiro, sugerindo a aplicabilidade de Pc-10 em programas de controle biológico. Mecanismos análogos a estes descritos possivelmente ocorreram no presente estudo, comprometendo em 83,7% a viabilidade e o desenvolvimento dos embriões de *B. tenagophila*.

Avaliando efeitos desenvolvidos por fungos ovicidas, autores têm considerado apenas o efeito tipo III como embriotóxico (FRASSY et al., 2010). Em contrapartida, no presente estudo, efeitos I e II foram também capazes de interferirem significativamente na viabilidade embrionária de *B. tenagophila*, mostrando-se

por isso certo potencial ovicida.

Em estudo conduzido por Duarte et al. (2015), constatou-se que a viabilidade dos ovos e a maturação das massas ovíferas de *B. glabrata* diminuíram significativamente após exposição aos conídios e hifas de *M. anisopliae*. Segundo os pesquisadores, a inibição da embriogênese decorreu possivelmente por meio da secreção/excreção de produtos oriundos do metabolismo fúngico que se difundiram pelas massas ovíferas e atingiram os embriões, comprometendo o seu desenvolvimento. Associado a isso, estudos evidenciaram que a diminuição no teor de oxigênio no interior de massas ovíferas de moluscos gastrópodes é tida como fator limitante à manutenção da viabilidade dos ovos (PRZESLAWSKI; BENKENDORFF, 2005). Assim, atividade micelial de *P. chlamydosporia*, isolado Pc-10, em massas ovíferas de *B. tenagophila* pode ter resultado em déficit na disponibilidade de oxigênio para os embriões, bem como na liberação de produtos embriotóxicos, interferindo significativamente a eclosão do planorbídeo.

Ocorrência de melanização em massas ovíferas de gastrópodes em resposta aos propágulos de fungos tem sido constatada (CASTRO et al., 2019). A melanina é um pigmento hidrofóbico e negativamente carregado, sintetizado mediante polimerização oxidativa de compostos fenólicos e representa um mecanismo de defesa contra patógenos muito importante para diversos invertebrados, incluindo *Biomphalaria* (BAI et al., 1996; BAHGAT et al., 2002). No entanto, no presente estudo, essa alteração não foi evidenciada, corroborando com as observações prévias estabelecidas por Duarte et al. (2015).

CONCLUSÃO

Pela primeira vez, a susceptibilidade de embriões de *B. tenagophila* a infecção por *P. chlamydosporia*, isolado Pc-10, foi caracterizada experimentalmente. O uso de fungos ovicidas, tal como *P. chlamydosporia*, isolado Pc-10, se mostrou eficiente em testes de viabilidade de massas ovíferas de *B. tenagophila*. O método proposto é executável e viável por comprometer significativamente a taxa de eclodibilidade dos moluscos em questão, implicados como hospedeiros intermediários de *S. mansoni*. Dessa forma, o mecanismo biológico desenvolvido pelo fungo poderá ser considerado uma alternativa interessante e sustentável no controle da esquistossomose mansônica.

REFERÊNCIAS

- ANDREWS, P.; THYSSEN, J.; LORKE, D. *The biology and toxicology of molluscicides, bayluscide*. Pharmacol, Ther. 19, 245–295, 1982. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(82\)90064-X](https://doi.org/10.1016/0163-7258(82)90064-X). Acesso em: abr 2020.
- BAHGAT, M.; DOENHOFF, M.; KIRSCHFINK, M.; RUPPEL, A. Serine protease and phenoloxidase activities in hemocytes of *Biomphalaria glabrata* snails with varying susceptibility to infection with the parasite *Schistosoma mansoni*. *Parasitol. Res.* 88, 489–494. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00436-002-0595-6>. Acesso em: mar 2022.
- BAI, G., LI, J.; CHRISTENSEN, B.M., YOSHINO, T.P. Phenoloxidase activity in the reproductive system and egg masses of the pulmonate gastropod, *Biomphalaria glabrata*. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 114, 353–359. 1996. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(96\)00045-4](https://doi.org/10.1016/0305-0491(96)00045-4). Acesso em: fev 2020.
- BARON, O. L.; VAN WEST, P.; INDUSTRI, B.; PONCHET, M.; DUBREUIL, G.; GOURBAL, B.; REICHHART, J. M.; COUSTAU, C. Parental transfer of the antimicrobial protein LBP/BPI protects *Biomphalaria glabrata* eggs against Oomycete Infections. *PLoS Pathog.* 9, 1–10. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003792>. Acesso em: mar 2020.
- BEZERRA, A.S. de A.; D'IPPOLITO, G.; CALDANA, R. P.; CECIN, A. O.; SZEJNFELD, J. Avaliação hepática e esplênica por ressonância magnética em pacientes portadores de esquistossomose mansônica crônica. *Radiol. Bras.* 37, 313–321. 2004. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/S0100-39842004000500003>. Acesso em: abr 2020.
- BRAGA, F. R.; ARAUJO, J. M.; SILVA, A. R.; DE ARAÚJO, J. V.; CARVALHO, R. O. de FREITAS, S. F. E.; QUEIROZ, J. H.; GÊNIER, H.L.A. Ação ovicida do extrato bruto enzimático do fungo *Pochonia chlamydosporia* sobre ovos de *Ancylostoma* sp. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 44, 116–118. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0037-86822011000100027>. Acesso em: ab 2020.
- BRAGA, F. R.; ARAÚJO, J. V.; CAMPOS, A. K.; ARAÚJO, J. M.; CARVALHO, R. O.; SILVA, A. R.; TAVELA, A. O. In vitro evaluation of the action of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium sinense* and *Pochonia chlamydosporia* on *Fasciola hepatica* eggs. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24, 1559–1564. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9643-9>. Acesso em: abr 2020.
- BRAGA, F. R., de ARAÚJO, J. V. Nematophagous fungi for biological control of gastrointestinal nematodes in domestic animals. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98(1), 71-82. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5366-z>. Acesso em: fev. 2020.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso*, 8th ed. Brasília. 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. *Vigilância da Esquistossomose mansoni: Diretrizes técnicas*, 4th ed, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília. 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. *Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica: diretrizes técnicas: Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose (PCE)*. 2008.
- CANTANHEDE, S. P. D.; MARQUES, A. de M.; SILVA-SOUZA, N.; VALVERDE, A. L. Atividade moluscicida de plantas: uma alternativa profilática. *Rev. Bras. Farmacogn.* 20(2), 282-288. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2010000200024>. Acesso em: fev 2020.
- CASTRO, L. S.; MARTINS, I. V. F.; TUNHOLI, V. M.; de ARAÚJO, J. V.; TUNHOLI-ALVES, V. M.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Ovicidal potential of *Pochonia chlamydosporia* isolate Pc-10 (Ascomycota: Sordariomycetes) on egg masses of the snail *Pseudosuccinea columella* (Mollusca: Gastropoda). *J. Invertebr. Pathol.* 166, 107212. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.107212>. Acesso em: fev 2020.
- CHENG, T. C. Biological control studies: Bacteria associated with moribund *Biomphalaria glabrata* (Mollusca) in the laboratory. *J. Invertebr. Pathol.* 47, 219–224. 1986. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(86\)90049-2](https://doi.org/10.1016/0022-2011(86)90049-2). Acesso em: mar 2020.

- DUARTE, G. F.; RODRIGUES, J.; FERNANDES, E. K. K.; HUMBER, R. A.; LUZ, C. New insights into the amphibious life of *Biomphalaria glabrata* and susceptibility of its egg masses to fungal infection. *J. Invertebr. Pathol.* 125, 31–36. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.12.013>. Acesso em: mai 2020.
- ESCUADERO, N.; FERREIRA, S. R.; LOPEZ-MOYA, F.; NARANJO-ORTIZ, M. A.; MARIN-ORTIZ, A. I.; THORNTON, C. R.; LOPEZ-LLORCA, L. V. Chitosan enhances parasitism of *Meloidogyne javanica* eggs by the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia*. *Fungal Biol.* 120, 572–585. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.12.005>. Acesso em: mai 2020.
- FARO, M. J.; PERAZZINI, M.; CORRÊA, L. dos R.; MELLO-SILVA, C. C.; PINHEIRO, J.; MOTA, E. M.; DE SOUZA, S.; de ANDRADE, Z.; JÚNIOR, A. M. Biological, biochemical and histopathological features related to parasitic castration of *Biomphalaria glabrata* infected by *Schistosoma mansoni*. *Exp. Parasitol.* 134, 228–234. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.03.020>. Acesso em: mar 2020.
- FRASSY, L. N.; BRAGA, F. R.; SILVA, A. R.; ARAÚJO, J. V.; FERREIRA, S. R.; FREITAS, L.G. Destruição de ovos de *Toxocara canis* pelo fungo nematófago *Pochonia chlamydosporia*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 43(1), 102-104. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0037-86822010000100024>. Acesso em: mar 2020.
- GOUDSMIT, E. M. Carbohydrate and carbohydrate metabolism in Mollusca, in: Florkin, M; Scheer, B. (Ed.). *Chemical Zoology*. Academic Press. New York, pp. 219–243. 1972.
- HARTMANN, D. B.; MARIM, R. A.; SILVA, Y. L.; ZARDETO, G.; SILVA, I. de A., MATTOS, D. de A.; LAVERDE JR., A. Lethality of *Synadenium grantii* Hook. f. (Euphorbiaceae) extract to snails *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (Gastropoda, Planorbidae). *Arq. Ciências Veterinárias e Zool. da UNIPAR* 14, 5–11. 2011.
- HENRIOUD, A. N. Towards sustainable parasite control practices in livestock production with emphasis in Latin America. *Vet. Parasitol.* 180, 2—11. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vevtpar.2011.05.026>. Acesso em: jun 2020.
- LAMBERTON, P. H. L.; KABATEREINE, N. B.; OGUTTU, D. W.; FENWICK, A.; WEBSTER, J. P. Sensitivity and specificity of multiple Kato-Katz thick smears and a circulating cathodic antigen test for *Schistosoma mansoni* diagnosis pre-and post-repeated-praziquantel treatment. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e3139. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003139>. Acesso em: jun 2020.
- LÝSEK, H.; STERBA, J. Colonization of *Ascaris lumbricoides* eggs by the fungus *Verticillium chlamydosporium* Goddard. *Folia Parasitol. (Praha)*. 38, 255–259. 1991.
- MACHADO, A. P. The Brazilian program for schistosomiasis control, 1975-1979. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 31, 76–86. 1982. Disponível em: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1982.31.76>. Acesso em: fevereiro de 2020.
- MACHADO, R. D.; SOUZA, W. de, 1998. *Desidratação, Inclusão, Ultramicrotomia e Contrastação*, in: Técnicas Básicas de Microscopia Eletrônica Aplicada ss Ciências Biológicas. Sociedade Brasileira de Microscopia, Rio de Janeiro, pp. 22–28. 1998.
- MANZANILLA-LÓPEZ, R. H.; ESTEVES, I.; FINETTI-SIALER, M. M.; HIRSCH, P. R.; WARD, E.; DEVONSHIRE, J.; HIDALGO-DÍAZ, L. *Pochonia chlamydosporia*: Advances and challenges to improve its performance as a biological control agent of sedentary endo-parasitic nematodes. *J. Nematol.* 45, 1–7. 2013.
- NACIFE, M. B. P.; SIQUEIRA, L. M. V.; MARTINS, R.; VIANNA, V. N.; BARBOSA, K. F.; MASIOLI, C. Z.; SILVA, J. C. da; MACHADO-COELHO, G. L. L. Prevalence of schistosomiasis mansoni in indigenous Maxakali villages, Minas Gerais, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 60. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s1678-9946201860026>. 2018. Acesso em: mai 2020.
- PASSOS, A.; AMARAL, R. Esquistossomose mansônica: aspectos epidemiológicos e de controle. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 31, 61–74. 1988.
- PRZESLAWSKI, R.; BENKENDORFF, K. The role of surface fouling in the development of encapsulated gastropod embryos. *J. Molluscan Stud.* 71, 75–83. 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/mollus/eyi010>. Acesso em: jun 2020.

- ROCHA, L. F. N.; TAI, M. H. H.; SANTOS, A. H.; SANTOS ALBERNAZ, D. A., HUMBER, R. A.; LUZ, C.. Occurrence of invertebrate-pathogenic fungi in a Cerrado ecosystem in Central Brazil. *Biocontrol Sci. Technol.* 19, 547–553. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/09583150902789337>. Acesso em: jun 2020.
- SINGER, S.; VAN FLEET, A .L.; VIEL, J. J.; GENEVESE, E. E. Biological control of the zebra mussel *Dreissena polymorpha* and the snail *Biomphalaria glabrata*, using Gramicidin S and D and molluscicidal strains of *Bacillus*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 18, 226–231. 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900371>. Acesso em: abr 2020.
- TUNHOLI, V. M.; LORENZONI, P. O.; SILVA, Y. H.; TUNHOLI-ALVES, V. M.; BOELONI, J. N.; SILVA, M. A.; MONTEIRO, C. O.; PRATA, M. C.A.; PINHEIRO, J.; MARTINS, I. V. F. Molluscicidal potential of *Heterorhabditis baujardi* (Rhabditida: Heterorhabditidae), strain LPP7, on *Lymnaea columella* (Gastropoda: Pulmonata): An alternative for biological control of fasciolosis. *Acta Trop.* 173, 23–29. 2017s. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.05.024>. Acesso em: fev 2020.
- TUNHOLI, V. M.; TUNHOLI-ALVES, V. M.; MONTEIRO, C. O.; SILVA, L. C. da, DOLINSKI, C. de M.; CASTRO, R. N.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; SILVA, J. P. da, FREIRE M, I. V. Biological, biochemical and histological features of *Bradybaena similaris* (Gastropoda: Pulmonata) infected by *Heterorhabditis indica* (Rhabditida: Heterorhabditidae) strain LPP1. *Exp. Parasitol.* 179, 28–35. 2017b Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.06.004>. Acesso em: fevereiro de 2020.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION, Schistosomiasis: number of people treated worldwide in 2009, *Wkly Epidemiol Rec.* Genebra. 2011.
- ZARE, R.; GAMS, W. *A revision of Verticillium section Prostrata*. VI. The genus *Haptocillium*. *Nov. Hedwigia* 73, 271–292. 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1127/nova.hedwigia/73/2001/271>. Acesso em: mai 2020.