

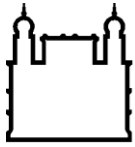
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

AÇÃO DE HERBICIDA À BASE DE GLIFOSATO SOBRE O CICLO  
BIOLÓGICO DE *Echinostoma paraensei* LIE & BASCH, 1967  
(TREMATODA: ECHINOSTOMATIDAE), EM CONDIÇÕES  
EXPERIMENTAIS.

TAINÁ CARNEIRO DE CASTRO MONTE

Rio de Janeiro  
Agosto/2018



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

### **Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde**

*TAINÁ CARNEIRO DE CASTRO MONTE*

Ação de herbicida à base de glifosato sobre o ciclo biológico de *Echinostoma paraensei* Lie & Basch, 1967 (Trematoda: Echinostomatidae), em condições experimentais.

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor(a) em Ciências.

**Orientador:** Dr. Arnaldo Maldonado Júnior

**Coorientador(a):** Dra. Marta Julia Faro dos Santos Costa

**RIO DE JANEIRO**

Agosto/2018

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

Carneiro de Castro Monte, Tainá.

Ação de herbicida à base de glifosato sobre o ciclo biológico de *Echinostoma paraensei* Lie & Basch, 1967 (Trematoda: Echinostomatidae), em condições experimentais. / Tainá Carneiro de Castro Monte. - Rio de Janeiro, 2018.

175 f.; il.

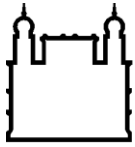
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde, 2018.

Orientador: Arnaldo Maldonado Júnior.

Co-orientadora: Marta Julia Faro dos Santos Costa.

Bibliografia: f. 95-124

1. *Echinostoma paraensei*. 2. Agrotóxico. 3. Ciclo biológico. 4. Biologia experimental. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

**AUTOR: TAINÁ CARNEIRO DE CASTRO MONTE**

### **AÇÃO DE HERBICIDA À BASE DE GLIFOSATO SOBRE O CICLO BIOLÓGICO DE *Echinostoma paraensei* LIE & BASCH, 1967 (TREMATODA: ECHINOSTOMATIDAE), EM CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS.**

**ORIENTADOR: Dr. Arnaldo Maldonado Júnior**

**COORIENTADORA: Dra. Marta Julia Faro dos Santos Costa**

**Aprovada em: 24 de Agosto de 2018.**

#### **EXAMINADORES:**

**Prof. Dra. Clélia Christina Mello Silva Almeida da Costa - Presidente** (Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ)

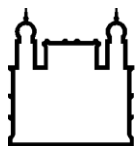
**Prof. Dra. Márcia Sarpa de Campos Mello** (Coordenação de Prevenção e Vigilância, Instituto Nacional do Câncer, INCA)

**Prof. Dr. Jairo Pinheiro da Silva** (Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, UFRRJ)

**Prof. Dr. Darcílio Fernandes Baptista** (Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ)

**Prof. Dr. José Augusto Albuquerque dos Santos** (Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ)

Rio de Janeiro, 24 de agosto de 2018.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**Anexar a cópia da Ata que será entregue pela SEAC já assinada.**

Aos meus pais, Murilo e Maria Madalena;  
aos meus irmãos: Talita, Tamara e  
Tadeu; e ao meu marido, Bruno, por todo  
apoio e torcida.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por todas as conquistas e oportunidades.

Ao meu amado e saudoso pai, Murilo, que partiu durante esta jornada mas que sempre me apoiou, ajudou e torceu para que este momento chegasse.

À minha mãe, Maria Madalena, a minha mãedrastra, Margareth, e aos meus irmãos Talita, Tamara e Tadeu pelo carinho, ajuda e paciência em todos os momentos da minha vida.

Ao meu marido, Bruno, por todo amor, carinho, ajuda e paciência. Por me ensinar tanto, todos os dias.

Ao meu orientador, Dr. Arnaldo Maldonado Júnior, pela dedicação, confiança, paciência e por compartilhar conhecimentos.

À minha coorientadora, Dra. Marta Julia Faro, também pela dedicação, pelo carinho e por toda calma e conhecimentos transmitidos.

Ao Dr. Juberlan Garcia, pela ajuda de sempre e pelos conhecimentos transmitidos na parte de infecção experimental realizada no estudo, e por toda dedicação e parceria.

À Dra. Helene Barbosa, Dra. Ester Mota e Dr. Arnon Juberg, pelo auxílio nas análises morfológicas; ao Dr. Maurício Vasconcellos pelo auxílio no preparo das soluções e determinação das concentrações utilizadas no presente trabalho; à Dra. Rosana Gentile, pelo auxílio nas análises estatísticas realizadas no estudo, e ao Dr. Álvaro Bertho pela colaboração para as análises de citometria de fluxo.

Às alunas de iniciação científica Brunna Braga e Vanessa Moura pelo o auxílio nos experimentos realizados.

Aos meus amigos e colegas do LABPMR: Ana Paula Gomes, Beatriz Elise, Raquel Simões, Juliana São Luiz, Camila Lucio, Thiago Cardoso, Raquel Gonzalez, Natália Costa, Michele Maria, Bernardo Teixeira, Sócrates Neto e Jeiel Gabrir, pela amizade, pelos momentos de risada e pela ajuda e compreensão nos momentos difíceis.

Ao Ricardo Baptista, pelo auxílio na parte de imagens e montagem de pranchas.

À secretária do PPGBS, Luciana Mara, por toda disponibilidade e esclarecimento.

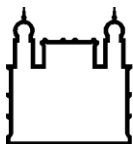
À Vice-Presidência de Educação, Informação e Comunicação – VPEIC / FIOCRUZ, pelo auxílio financeiro.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo auxílio financeiro.

*“Why should you worry about the future? You don't even know the present properly. Take care of the present and the future will take care of itself.”*

Ramana Maharshi





Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

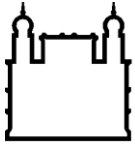
### AÇÃO DE HERBICIDA À BASE DE GLIFOSATO SOBRE O CICLO BIOLÓGICO DE *Echinostoma paraensei* LIE & BASCH, 1967 (TREMATODA: ECHINOSTOMATIDAE) EM CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS.

#### RESUMO

#### TESE DE DOUTORADO EM BIODIVERSIDADE E SAÚDE

**Tainá Carneiro de Castro Monte**

O uso de agrotóxicos na agricultura é motivo de preocupação devido a seu impacto no ambiente, saúde humana e animal. No Brasil, entre os herbicidas convencionais, o mais comercializado é o glifosato, representando a formulação comercial do Roundup®. Nesse estudo, relatamos os efeitos biológicos, morfológicos e na relação parasito-hospedeiro intermediário, após exposição do trematódeo *Echinostoma paraensei* a diferentes concentrações do herbicida Roundup® Original, em condições experimentais. Foram identificados efeitos biológicos significativos no que se refere a mortalidade *in vitro* dos estádios de miracídio, cercária, larva recém desencistada, helminto jovem e adulto de *E. paraensei*, bem como efeitos na taxa de desencistamento de metacercárias *in vitro* e na eclosão de miracídios. Efeitos morfológicos foram observados, como inchaço do tegumento com perda de espinhos no colar peristômico, descamação, presença de vesículas e contração muscular. Vacuolização de células do ceco com dano epitelial, ruptura do parênquima testicular, desorganização de ácinos de glândulas vitelínicas e tegumento alterado, com estruturas reduzidas e danificadas e camadas musculares desorganizadas, também foram constatados. Pela análise de citometria de fluxo, diferenciação morfológica e viabilidade de hemócitos de *Biomphalaria glabrata* infectado com *E. paraensei* e/ou exposto ao herbicida, foram observadas alterações no sistema interno de defesa do molusco. Três subpopulações de hemócitos foram definidas por granularidades diferentes (baixa, média e alta), e um aumento significativo de morte celular no grupo infectado e tratado pelo Roundup® Original. Pela análise de diferenciação morfológica, foi observado três tipos celulares distintos: células blásticas, hialinócitos e granulócitos, sendo os hialinócitos as células mais numerosas encontradas em todos os grupos experimentais, e o único tipo celular a mostrar diferenças entre todos os grupos. Os achados do presente estudo mostram que os estádios de *E. paraensei* foram afetados biologicamente e morfológicamente, pela exposição ao Roundup® Original em condições experimentais, assim como ocasionou um maior comprometimento do sistema imune do hospedeiro intermediário, provavelmente modificando essa interação.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

## OSWALDO CRUZ INSTITUTE

### ACTION OF GLYPHOSATE-BASED HERBICIDE ON THE BIOLOGICAL CYCLE OF *Echinostoma paraensei* LIE & BASCH, 1967 (TREMATODA:ECHINOSTOMATIDAE) UNDER EXPERIMENTAL CONDITIONS.

#### ABSTRACT

#### DOCTORAL THESIS ON BIODIVERSITY AND HEALTH

**Tainá Carneiro de Castro Monte**

The use of pesticides in agriculture is of concern because of its impact on the environment, human and animal health. In Brazil, among the conventional herbicides, the most commercialized is glyphosate, representing the Roundup® commercial formulation. In this study, we report the biological, morphological and parasite- intermediate host effects after exposure of the trematode *Echinostoma paraensei* to different concentrations of the Roundup® Original herbicide, under experimental conditions. Significant biological effects have been identified with regard to the *in vitro* mortality of the stages of miracidia, cercariae, newly excysted larvae, young and adult helminths of *E. paraensei*, as well as effects on the excystment rate of metacercariae *in vitro* and on miracidia hatching. Morphological effects were observed, such as swelling of the tegument with loss of spines in the peristomic collar, peeling, presence of vesicles and muscle contraction. Vacuolization of cecal cells with epithelial damage, rupture of the testicular parenchyma, disorganization of ácinos vitelline glands and altered tegument, with reduced and damaged structures and disorganized muscle layers, were also observed. By flow cytometric analysis, morphological differentiation and viability of hemocytes of *Biomphalaria glabrata* infected with *E. paraensei* and / or exposed to the herbicide, changes were observed in the internal defense system of the snail. Three subpopulations of hemocytes were defined by different granularities (low, medium and high), and a significant increase in cell death in the infected + Roundup® Original-treated group. By morphological analysis, three distinct cell types were observed: blast-like cells, hyalinocytes and granulocytes, being hyalinocytes the most numerous cells found in all experimental groups, and the only cell type to show differences among all groups. The findings of the present study show that the stages of *E. paraensei* were biologically and morphologically affected by exposure to Roundup® Original under experimental conditions, as well as caused a greater demand of the immune system of the intermediate host, probably modifying this interaction.

## ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	XIV
LISTA DE TABELAS	XIX
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	XXI
<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Consumo de agrotóxicos no Brasil</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 O herbicida glifosato .....	3
1.1.2 Efeitos do glifosato em organismos não alvo.....	6
1.1.3 Ação de agrotóxicos em moluscos hospedeiros intermediários .....	7
<b>1.2 <i>Echinostoma paraensei</i></b> .....	<b>8</b>
1.2.1 Características gerais .....	8
1.2.2 Morfologia da forma adulta de <i>E. paraensei</i> .....	10
1.2.3 Ciclo biológico de <i>E. paraensei</i> .....	12
1.2.4 <i>Echinostoma paraensei</i> como modelo experimental .....	14
<b>2 JUSTIFICATIVA</b>	<b>16</b>
<b>3 OBJETIVOS</b>	<b>17</b>
<b>3.1 Objetivo Geral</b> .....	<b>17</b>
<b>3.2 Objetivos Específicos</b> .....	<b>17</b>
<b>CAPÍTULO I - O QUE SABEMOS SOBRE OS EFEITOS DE AGROTÓXICOS EM HELMINTOS?</b>	<b>18</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>19</b>
<b>2. EFEITOS DE AGROTÓXICOS SOBRE O PARASITISMO</b> .....	<b>21</b>
<b>3. EFEITOS DE AGROTÓXICOS SOBRE HELMINTOS         UTILIZADOS COMO ORGANISMO MODELO</b> .....	<b>23</b>
<b>4. EFEITOS EM NEMATOIDES PARASITOS DE PLANTAS</b> .....	<b>25</b>
<b>5. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO</b> .....	<b>27</b>

**CAPÍTULO II - EFEITOS *IN VIVO* E *IN VITRO* DO HERBICIDA  
ROUNDUP SOBRE OS ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO DO  
TREMATÓDEO *Echinostoma paraensei***

**29**

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>30</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>32</b>
<b>2.1 O isolado <i>E. paraensei</i> .....</b>	<b>32</b>
2.1.1 Obtenção dos estádios de miracídio e cercária .....	32
2.1.2 Obtenção de larvas recém desencistadas .....	33
2.1.3 Infecção experimental de roedores e obtenção de helmintos adultos .....	34
<b>2.2 Exposição ao Roundup .....</b>	<b>34</b>
2.2.1 Concentrações utilizadas nos experimentos .....	34
2.2.2 Efeitos <i>in vitro</i> na eclosão de miracídios de <i>E.</i> <i>paraensei</i> .....	35
2.2.3 Mortalidade e cultivo <i>in vitro</i> .....	35
2.2.4 Taxa de desencistamento de metacercárias .....	36
2.2.5 Carga parasitária e produção de ovos .....	36
<b>2.3 Análise estatística .....</b>	<b>37</b>
<b>3. RESULTADOS .....</b>	<b>37</b>
<b>3.1 Taxa de eclosão de miracídios .....</b>	<b>37</b>
<b>3.2 Mortalidade <i>in vitro</i> .....</b>	<b>38</b>
<b>3.3 Taxa de desencistamento de metacercárias de             <i>E. paraensei</i> .....</b>	<b>42</b>
<b>3.4 Carga parasitária e produção de ovos <i>in vivo</i> .....</b>	<b>43</b>
<b>4. DISCUSSÃO .....</b>	<b>44</b>
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>49</b>

**CAPÍTULO III - EFEITOS MORFOLÓGICOS EM HELMINTO PARASITO  
CAUSADO POR HERBICIDA EM CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS**

**50**

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>51</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>51</b>
<b>2.1 Parasitos e infecção experimental .....</b>	<b>51</b>

2.2	Concentrações de Roundup e exposição <i>in vitro</i> .....	52
2.3	Análises morfológicas.....	53
2.4	Análise estatística.....	54
3.	RESULTADOS.....	55
3.1	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	55
3.2	Histopatologia.....	58
3.3	Microscopia a Laser de Varredura Confocal (MLVC).....	65
4.	DISCUSSÃO.....	68
5.	CONCLUSÃO.....	71

**CAPÍTULO IV - ALTERAÇÕES DE HEMÓCITOS HEMOLINFÁTICOS NA EXPOSIÇÃO DE *Biomphalaria glabrata* INFECTADO COM *Echinostoma paraensei* AO HERBICIDA GLIFOSATO**

		<b>72</b>
1.	INTRODUÇÃO.....	73
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	75
2.1	Manutenção de <i>B. glabrata</i> e <i>E. paraensei</i> em condições laboratoriais.....	75
2.2	Infecção experimental.....	76
2.3	Exposição ao herbicida.....	77
2.4	Desenho experimental.....	77
2.5	Viabilidade dos hemócitos.....	79
2.6	Diferenciação morfológica de hemócitos.....	79
2.7	Análise de citometria de fluxo.....	80
2.8	Análise estatística.....	83
3.	RESULTADOS.....	83
3.1	Viabilidade de hemócitos pela câmara de Neubauer.....	83
3.2	Diferenciação morfológica de hemócitos por microscopia.....	84
3.3	Citometria de fluxo.....	87
4.	DISCUSSÃO.....	90

<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES GERAIS</b>	<b>94</b>
<b>5</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>95</b>
	<b>ANEXOS</b>	<b>125</b>
	<b>ANEXO I - ARTIGO PUBLICADO: WHAT DO WE KNOW ABOUT THE EFFECTS OF PESTICIDES ON HELMINTHS?.....</b>	<b>126</b>
	<b>ANEXO II - ARTIGO PUBLICADO: <i>IN VIVO</i> AND <i>IN VITRO</i> EFFECTS OF HERBICIDE ROUNDUP® ON THE DEVELOPMENT STAGES OF THE TREMATODE <i>Echinostoma paraensei</i>.....</b>	<b>132</b>
	<b>ANEXO III - ARTIGO PUBLICADO: MORPHOLOGICAL EFFECTS ON THE HELMINTH PARASITES CAUSED BY HERBICIDE UNDER EXPERIMENTAL CONDITIONS.....</b>	<b>140</b>
	<b>ANEXO IV - ARTIGO SUBMETIDO: CHANGES IN HEMOCYTES OF <i>BIOMPHALARIA GLABRATA</i> INFECTED WITH <i>Echinostoma paraensei</i> AND EXPOSED TO THE HERBICIDE GLYPHOSATE.....</b>	<b>151</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO GERAL

<b>Figura 1:</b> Estrutura química do glifosato (Fonte: IARC, 2017).....	5
<b>Figura 2:</b> Mecanismo de ação do glifosato na via do ácido chiquímico, que leva a formação de aminoácidos essenciais para a planta (Fonte: Yamada & Castro, 2007. Adaptada de Graham & Webb, 1991).....	5
<b>Figura 3:</b> <i>Echinostoma paraensei</i> . <b>a</b> Helminto adulto com 28 dias (barra=1mm) <b>b</b> Colar cefálico com espinhos (barra=100µm) (Fonte: Adaptado de Maldonado et al., 2001a).....	11
<b>Figura 4:</b> Ciclo biológico de <i>Echinostoma paraensei</i> (Fonte: LABPMR, 2001).....	14

### CAPÍTULO I

<b>Figura 1:</b> Os principais aspectos de agrotóxicos sobre helmintos .....	20
--	----

### CAPÍTULO II

<b>Figura 1:</b> Obtenção dos diferentes estádios de <i>Echinostoma paraensei</i> em condições experimentais .....	33
<b>Figura 2:</b> Número médio de ovos de <i>Echinostoma paraensei</i> e desvios padrão recuperados 21 dias após a infecção de <i>Mesocricetus auratus</i> com 30 metacercárias previamente expostas por duas horas a diferentes concentrações de Roundup®. ....	43
<b>Figura 3:</b> Taxa de desencistamento (%) de metacercárias de <i>Echinostoma paraensei in vitro</i> (n = 60) anteriormente expostas a diferentes concentrações de Roundup® (mg/L), ao longo do tempo .....	44

### CAPÍTULO III

<b>Figura 1:</b> Micrografia eletrônica de varredura de <i>Echinostoma paraensei</i> . <b>A-B</b> Grupo controle: Larvas - Colar peristômico preservado (pc) (A). Barra: 20 µm.	
---	--

Detalhe da ventosa oral preservada (os) rodeada pelo colar peristômico com espinho (s) e presença de papilas (p) (B). Barra: 10 µm. **C** Grupo exposto por duas horas a 225 mg/L de Roundup®: Larvas - Enrugamento da superfície do tegumento, incluindo o ventosa ventral (vs) e a região do colar peristômico (pc), e um nó terminal posterior devido à intensa contração da musculatura. Barra: 20 µm. **D-F** Grupo controle: helmintos de 7 dias - colar peristômico (pc) e ventosa oral (os) com morfologia preservada. Espinhos latero-dorsais preservados (lds) e espinhos ventrais (vsp) (D). Barra: 20 µm. Helmintos de 14 dias anterior - ventosa ventral preservada (vs) e poro genital proeminente (gp) (E). Bar: 100 µm. Helmintos de quatorze anos - Poro excretor (ep) com aspecto preservado (F). Barra: 10 µm. **G-H** Grupo exposto por duas horas a 225 mg/L de Roundup®: helmintos de 14 dias - Tegumento do poro excretor com vesículas (ves) (G). Barra: 10 µm. Tegumento inchado com espinho (s) submerso (s) pelo tegumento ao redor (H). Barra: 10 µm. **I-M** Grupo exposto por duas horas a 450 mg/L e 900 mg/L de Roundup®: helmintos de 7 dias - região do colar peristômico com perda de espinhos (\* ls) (I). Barra: 20 µm. Helmintos de 14 dias - descamação da região dorsal do corpo (p) e enrugamento do colar peristômico sem espinhos (pc) (J). Bar: 100 µm. Corpo com tegumento inchado e enrugado. Ventosa ventral (vs) (L). Barra: 500 µm. Contração muscular (mc) na região pós acetabular (vs) (M). Bar: 100 µm.....57

**Figura 2:** Seções histológicas de *Echinostoma paraensei* com 14 dias pós-infecção corados em HE. **A** Grupo controle: Ceco com lúmen fino (tl) e células cilíndricas com núcleo basal (bn) com um ou dois nucleolos. **B** Grupo exposto por duas horas a 900 mg/L de Roundup®: células do ceco com presença de vacúolos (v). **C** Grupo controle: Testículos com aparência normal de divisão celular (dc) com feixe de esperma(s). **D** Grupo exposto por duas horas a 900 mg/L de Roundup®: ruptura do parênquima testicular (tp) evidenciando o processo de diferenciação (dp), com presença de esperma (s). **E** Grupo controle: Tegumento preservado com sincício (s), lâmina basal (bl), camada muscular circular (\* cm) e longitudinal (\* lm) e tecido conjuntivo frouxo com células do parênquima (pc). **F** Grupo exposto por duas horas a 900 mg/L de



Roundup®: Tegumento alterado (ct) com células parenquimatosas desordenadas (pc). Barra: 50 µm.....60

**Figura 3:** Seções histológicas de *Echinostoma paraensei* de 14 dias coradas em PSA e Reticulina de Gomori. PSA: **A** Grupo controle: presença de conteúdo glicídico intenso no parênquima e ácinos de glândulas vitelínicas (vg). Ceco (c), testículo (t) e tegumento (teg) preservados. **B** Grupo exposto por duas horas a 900 mg/L de Roundup®: diminuição do conteúdo glicídico no parênquima e nas glândulas vitelínicas (vg) com lâmina basal (bl) evidente pela perda de tegumento. Ceco (c). Reticulina de Gomori: **C** Grupo controle: Ceco (c) e glândulas vitelínicas (vg) com morfologia preservada. Lâmina basal evidente (bl). **D** Grupo exposto por duas horas a 900 mg/L de Roundup®: degeneração do ceco (c) e células vitelínicas (vg) que não apresentam núcleos. Barra: 50 µm.....64

**Figura 4:** Imagens de microscopia a laser de varredura confocal de preparações de montagem completa de *Echinostoma paraensei* de 14 dias corado com Carmim clorídrico: **A** Grupo controle: Ácinos de glândulas vitelínicas preservadas (vg) com células vitelínicas (vc) com aspecto normal, bem como parênquima do corpo (p). **B** Grupo controle: Ceco com forma preservada com lúmen fino (c). **C** Grupo exposto por duas horas a 900 mg/L de Roundup®: Ácinos de glândulas vitelínicas com células com núcleos perdidos (vg). **D** Grupo exposto por duas horas a 900 mg/L de Roundup®: ceco com dano aparente ao epitélio cecal (c). Bar 100 µm.....67

#### CAPÍTULO IV

**Figura 1:** Manutenção de moluscos *Biomphalaria glabrata* em laboratório (Fonte: Moura, 2017) .....76

**Figura 2:** Grupos experimentais e análises empregadas no estudo.....78

**Figura 3:** Câmara de Neubauer espelhada utilizada para análise da viabilidade dos hemócitos (Fonte: Moura, 2017).....79

**Figura 4:** Procedimento de preparação das lâminas para a diferenciação morfológica dos hemócitos (Fonte: Moura, 2017).....80

**Figura 5:** Estratégia de *gate* de citometria de fluxo para análise de hemócitos em moluscos *Biomphalaria glabrata*. (A) diagrama de pontos FSC-A vs FSC-H, para exclusão de *doublets* (*singlets gate*); (B) gráfico de pontos de morfologia (SSC-A versus FSC-A). Três regiões foram criadas em torno de granularidade baixa (canais SSC entre 20-140), média (canais SSC entre 150-290) e alta (SSC canais entre > 300) SSC; (C, D e E) histogramas de fluorescência relativos à incorporação de PI (PE-H) por subpopulações de SSC baixa, média e alta, respectivamente; e (F, G e H) em relação à coloração com PNA (FITC-H). Esses gráficos são representativos para os 4 experimentos.....82

**Figura 6:** Análise da porcentagem (%) de hemócitos mortos, de dez moluscos de cada grupo experimental (n = 40), através do método de exclusão do corante vital Azul de Tripán, pela câmara de Neubauer. Os dados estão representados como média ± erro padrão. Houveram diferenças nas porcentagens de hemócitos mortos entre os grupos estudados (teste paramétrico: Test T). \* p <0,05.....84

**Figura 7:** Diferenciação morfológica de hemócitos de dez moluscos *Biomphalaria glabrata* de cada grupo experimental (n = 40): Controle (C); Tratado (T); Infectado (I); Infectados e Tratados (I + T), por microscopia ótica - células blásticas (Bl); Hialinócitos (Hi) e Granulócitos (Gr), usando um microscópio Zeiss Stemi SV6 (100X de ampliação).....85

**Figura 8:** Diferenças na média da contagem absoluta de hialócitos entre quatro grupos experimentais (C = controle; T = tratado; I = infectado; I + T: infectado e tratado). \* p <0,05; \*\*\* p <0,001; \*\*\*\* p <0,0001.....86

**Figura 9:** Análises de citometria de fluxo de três subpopulações celulares - Baixa, Média e Alta. Cada barra representa as porcentagens (%) de hemócitos marcados com PNA nos quatro grupos experimentais: Controle (C); Tratado (T); Infectado (I); Infectado e Tratado (I + T). Os dados estão representados como média ± erro padrão das subpopulações de hemócitos. Não houve

diferenças nas porcentagens de hemócitos entre cada grupo estudado (teste não paramétrico de Mann-Whitney). \*  $p > 0,05$ .....87

**Figura 10:** Análise de citometria de fluxo de três subpopulações de células - (A) Baixa, (B) Média e (C) Alta SSC. Cada barra representa as porcentagens (%) de hemócitos marcados com PI nos quatro grupos experimentais: Controle (C); Tratado (T); Infectado (I); Infectado e Tratado (I + T). Os dados estão representados como média  $\pm$  erro padrão das subpopulações de hemócitos. Houve diferenças nas porcentagens de hemócitos entre os grupos estudados (teste não paramétrico de Mann-Whitney). \*  $p < 0,05$ .....88

**Figura 11:** Análise de citometria de fluxo de quatro grupos experimentais - Controle (C); Tratado (T); Infectado (I); Infectado e Tratado (I + T). Cada barra representa as porcentagens (%) de hemócitos marcados com PI nas três subpopulações celulares: Baixa, Média e Alta. Os dados estão representados como média  $\pm$  erro padrão das subpopulações de hemócitos em cada grupo experimental. Houve diferenças nas porcentagens de hemócitos entre as subpopulações celulares estudadas (teste não paramétrico de Mann-Whitney). \*  $p < 0,05$ .....89

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO II

**Tabela 1:** Taxa de eclosão de miracídios (%) de *E. paraensei in vitro* (n=90) após 24h de exposição a diferentes concentrações de Roundup em diferentes períodos embrionários.....38

**Tabela 2:** Mortalidade (%) de miracídios de *Echinostoma paraensei in vitro* (n = 30) após 180 minutos de exposição a diferentes concentrações de Roundup®.....39

**Tabela 3:** Mortalidade *in vitro* (%) de cercárias de *Echinostoma paraensei* (n = 30) após 180 minutos de exposição a diferentes concentrações de Roundup®.....40

**Tabela 4:** Mortalidade *in vitro* (%) de larvas recém desencistadas (n=120) e helmintos recuperados após sete (n=40) e catorze dias (n=40) de infecção em *Mesocricetus auratus* (hamsters) após exposição a diferentes concentrações de Roundup® em diferentes intervalos de tempo.....41

**Tabela 5:** Modelos testados para comparações das taxas de mortalidade entre diferentes estádios de desenvolvimento de *Echinostoma paraensei* (Larva recém desencistada, helmintos com sete e catorze dias) e entre diferentes concentrações de Roundup® usando modelos lineares generalizados (GLM). O melhor modelo foi escolhido usando os Critérios de Informação Akaike.....41

### CAPÍTULO III

**Tabela 1:** Medições de cortes histológicos de seis espécimes de *Echinostoma paraensei* para avaliar os danos causados pelo herbicida Roundup®, realizado em duplicata.....61

## CAPÍTULO IV

**Tabela 1:** Diferentes tipos de hemócitos circulantes de *Biomphalaria glabrata* tratados ou não ao Roundup® e / ou infectados com *Echinostoma paraensei*. Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão (n=10).....86

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

%	Por cento
°C	Grau Celsius
µg/mL	Micrograma por mililitro
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
ABA	Associação Brasileira de Agroecologia
ABRASCO	Associação Brasileira de Saúde Coletiva
AICc	Corrected Akaike Information Criterion
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APA	Agência de Proteção Ambiental
Bl	Células bláticas
C	Grupo Controle
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de cálcio
CEUA	Comitê de Ética ao Uso de Animais
CL <sub>50</sub>	Concentração letal média
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DP	Desvio padrão
EPSP <sub>s</sub>	5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase
EUA	Estados Unidos da América
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FSC	Forward scatter
FSC-A	Forward scatter-A

FSC-H	Forward scatter-H
g	Gramma
g/L	Gramma por litro
GLM	General Linear Models
Gr	Granulócitos
h	Hora
HE	Hematoxilina-Eosina
Hi	Hialinócitos
I	Grupo Infectado
i.a.	Ingrediente ativo
I+T	Grupo Infectado e Tratado
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
KCl	Cloreto de potássio
L	Litro
LABPMR	Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios
M	Molar
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mg/g	Miligramma por grama
mg/Kg	Miligramma por quilo
mg/L	Miligramma por litro
mg/mL	Miligramma por mililitro
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de magnésio
min	Minuto

MLVC	Microscopia a Laser de Varredura Confocal
mm	Milímetro
MMA	Ministério do Meio Ambiente
MS	Ministério da Saúde
NaCl	Cloreto de sódio
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	Fosfato de sódio monobásico
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sódio
nm	Nanômetro
O <sub>2</sub>	Oxigênio
OMS	Organização Mundial de Saúde
O <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	Tetróxido de ósmio
PAS	Periodic Acid Schiff
PAs	Pyrrrolizidine alkaloids
PES	Produtos Excreção e Secreção
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Propidium iodide
PL	Projeto de Lei
PNA	Peanut agglutinin
PNARA	Política Nacional de Redução de Agrotóxicos
POEA	Polioxietileno Amina
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SID	Sistema Interno de Defesa
SSB	Solução Salina Balanceada
SSBC	Solução Salina Balanceada de Chernin
SSC	Side scatter
T	Grupo Tratado



TB	Tripsina e Sais de bile
U/mL	Unidade por mililitro
W	Watt

# 1. Introdução geral

## 1.1 O consumo de agrotóxicos no Brasil

Agrotóxicos são compostos utilizados para controle de pragas e/ou promoção da produção agrícola. Nos últimos anos, o Brasil vem se tornando um dos maiores produtores de *commodities* agrícolas como soja, milho, café e açúcar. Os produtores que utilizam este modelo, dependem do uso de insumos e fertilizantes químicos, visando aumentar a produtividade, contribuindo para que o país ocupe o posto de um dos maiores consumidores de agrotóxicos no mundo (Gurgel et al., 2017). O Brasil ultrapassou os EUA no que tange o mercado de agrotóxicos, e enquanto o mercado mundial cresceu 93%, o mercado brasileiro cresceu 190%, abrigando as maiores empresas controladoras desse mercado (multinacionais) (BASF, Bayer, Dupont, Monsanto, Syngenta, Dow). Em 2010, a América Latina consumia 22% desses produtos, sendo o Brasil responsável por 19% do consumo. (ANVISA, 2012; ABRASCO, 2012).

Os agrotóxicos utilizados atualmente são classificados em diferentes classes, e dentre estas, se destacam os inseticidas, herbicidas, fungicidas e moluscicidas. Os herbicidas representam 45% do total de agrotóxicos comercializados, os fungicidas correspondem a 14%, os inseticidas 12% e as demais categorias de agrotóxicos por 29% (ANVISA; UFPR, 2012). Cerca de 434 ingredientes ativos (i.a.) e 2,400 formulações de agrotóxicos estão registrados no Ministério da Saúde (MS), Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e Ministério do Meio Ambiente (MMA), sendo seu uso permitidos no Brasil. Porém, dos 50 mais utilizados no controle de pragas agrícolas no país, 22 já são proibidos na União Européia. Desde 2008, 14 agrotóxicos estão em processo de revisão na ANVISA, onde quatro deles já foram proibidos (ANVISA, 2008; 2012a; 2012b).

A intensidade de uso de agrotóxicos no Brasil varia de acordo com a região geográfica e a propriedade (tradicional de subsistência e a moderna agricultura comercial). Verifica-se que 27% das pequenas propriedades fazem uso de agrotóxicos, 36% das propriedade de médio porte, e, nas propriedades com mais de 100 hectares, 80% utilizam agrotóxicos (IBGE, 2006;

Bombardi, 2011). As monoculturas de soja, milho, cana, cítricos, algodão e arroz são as que utilizam as maiores concentrações de agrotóxicos, e o Estado do Mato Grosso é o maior consumidor destes produtos (18,9%), seguido de São Paulo (14,5%), Paraná (14,3%), Rio Grande do Sul (10,8%), Minas Gerais (9%), Goiás (8,8%), Bahia (6,5%), Mato Grosso do Sul (4,7%) e Santa Catarina (2,1%). Os demais Estados totalizam 10,4% do consumo do país (IBGE, 2006; ABRASCO, 2012; Theisen, 2018).

Recentemente, o Projeto de Lei (PL) nº 6.299/2002, o qual propõe modificações no sistema de regulação de agrotóxicos e seus componentes, denominado "Pacote do Veneno", foi aprovado pela comissão especial da Câmara dos Deputados (FIOCRUZ, 2018). Esta nomenclatura foi dada por diversas entidades, órgãos e movimentos, referente ao objetivo de desmonte do sistema normativo regulatório de agrotóxicos no Brasil. Este PL representa uma série de flexibilizações e redução de custos para o setor produtivo, negligenciando os impactos para a saúde e meio ambiente, restringindo a atuação dos órgãos de saúde e ambiente em todo o processo de liberação e controle dos agrotóxicos, concentrando as competências no setor da agricultura, destacando a eliminação dos atuais critérios de proibição de registro de agrotóxicos (principalmente carcinogenicidade, mutagenicidade, teratogenicidade, distúrbios hormonais e danos ao sistema reprodutivo), a possibilidade de comercialização de produtos que ainda não tenham sido autorizados pelos órgãos de governo, mediante a criação do registro temporário e da autorização temporária, sendo considerado por diversas instituições como uma série de retrocessos (ABRASCO & ABA, 2018; FIOCRUZ, 2018).

O Dossie Científico e Técnico contra o Projeto da Lei (PL) do Veneno, elaborado pela Associação Brasileira de Saúde Coletiva (ABRASCO) e Associação Brasileira de Agroecologia (ABA), reúne 15 notas técnicas contrárias a esta PL fazendo uma análise de todos os argumentos apresentados, a favor da criação da Política Nacional de Redução de Agrotóxicos (PNARA), instituída

através do PL 6670/2016, o qual propõe a redução progressiva do uso de agrotóxicos, o controle destes produtos, bem como o desenvolvimento de alternativas biológicas e naturais de defensivos agrícolas (ABRASCO & ABA, 2018). Dentre as organizações que se posicionam contra a PL do veneno e a favor da PNARA estão instituições científicas como FIOCRUZ e INCA, sociedades científicas e órgãos técnicos da área de saúde e ambiente.

### **1.1.1 O Herbicida glifosato**

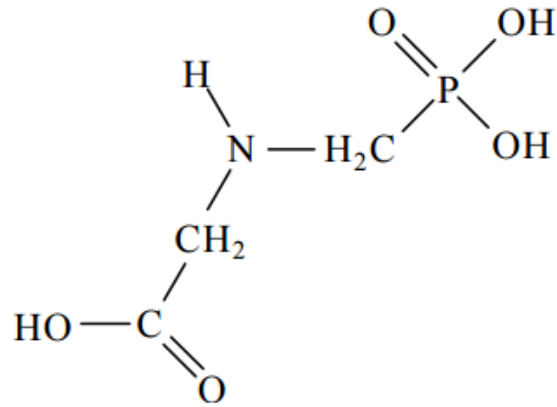
O glifosato (N-(fosfometil)glicina) é um herbicida não seletivo, sistêmico, pós-emergente (aplicado após o crescimento da planta), que apresenta elevada eficiência na eliminação de todos os tipos de plantas indesejáveis a plantação, incluindo ervas daninhas, gramas, perenes, arbustos e árvores (IARC, 2017) (Figura 1). Foi sintetizado em 1950 como potencial quelante industrial, porém a partir da década de 1970 começou a ser utilizado como herbicida, sendo comercializado em três tipos principais: glifosato-isopropilamônio, glifosato-sesquisódio (patenteados por Monsanto e vendido como Roundup), e glifosato-trimesium (patenteado por ICI, atual Syngenta) (Amarante Junior et al., 2002; Yamada & Castro, 2007; IARC, 2017). Este herbicida foi originalmente fabricado nos EUA e atualmente apresenta mais de 150 marcas comerciais sendo registrado para o uso em mais de 130 países, apresentando 91 produtores entre diferentes países como China, Índia, EUA, Austrália, Canadá, União Européia, entre outros (Amarante Junior et al., 2002; Toni et al., 2006; IARC 2017).

A introdução do glifosato em uma variedade de cultivos de produtos geneticamente modificados (transgênicos) foi projetada para que estes se tornassem resistentes ao herbicida, transformando-o em um herbicida seletivo para o uso em cultivos anuais (Duke & Powles, 2009; IARC, 2017). Esta variedade de transgênicos resistentes ao glifosato foram responsáveis por 45% da demanda mundial do herbicida em 2012, e seu uso para este fim está crescendo nos últimos anos. Porém, em países onde o cultivo de transgênicos é restrito, como na Europa, a principal aplicação do herbicida se dá como tratamento na fase de pós-colheita. O uso contínuo e intenso do glifosato na

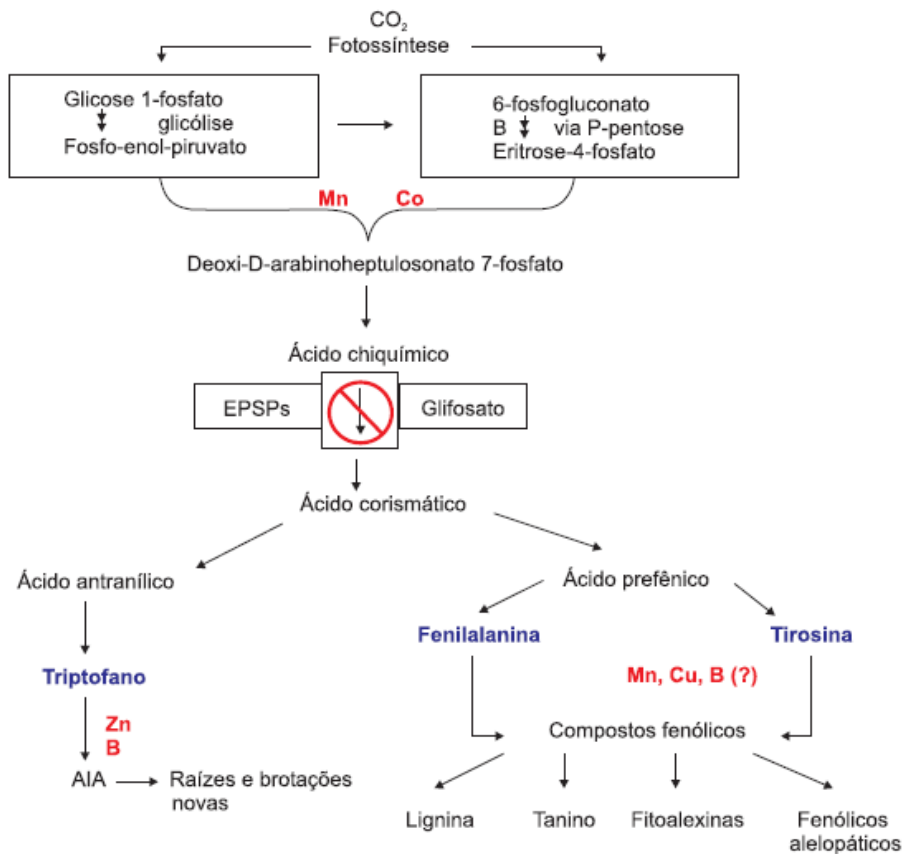
agricultura pode gerar a emergência de ervas resistentes ao produto, o que pode reduzir sua eficácia (Duke & Powles, 2009; IARC, 2017).

O mecanismo de ação do glifosato é bastante singular pois ele é o único herbicida capaz de inibir a enzima 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato-sintase (EPSPs) que atua em uma via metabólica conhecida como via do chiquimato, catalisando a condensação do ácido chiquímico a partir de dois metabólitos da glicose: o fosfoenolpiruvato e a eritrose-4-fosfato, evitando a síntese de três aminoácidos essenciais: triptofano, fenilalanina e tirosina (Jaworski, 1972; Zablutowicz & Reddy, 2004; Yamada & Castro, 2007) (Figura 2). A via do chiquimato ocorre apenas em plantas e microorganismos sendo completamente ausente em outras formas de vida como mamíferos, anfíbios, peixes, pássaros, répteis e insetos. Estes organismos não dependem desta via metabólica para a aquisição de produtos aromáticos, retirando-os da dieta, sendo por isso o glifosato considerado pelo fabricante como um herbicida com características ambientais favoráveis (Gruys & Sikorski, 1999; Yamada & Castro, 2007).

Seja como sal de amônio ou sódio, glifosato é um organofosfato que não afeta o sistema nervoso da mesma maneira que outros organofosforados (em geral inseticidas, inibidores da enzima colinesterase). Apesar de ser atribuída pouca toxicidade ao glifosato, sendo considerado com pouco risco e efeitos adversos para animais e meio ambiente, há evidências de efeitos deletérios tanto no ambiente quanto em outros organismos além daqueles para os quais ele foi recomendado, como diferentes tipos de cânceres em humanos (pulmão, próstata, linfoma, leucemia, etc.) (Amarante Junior et al., 2002; Lushchark et al., 2009; Hock & Poulin, 2012; Cattani et al., 2014; Lanctôt et al., 2014; Navarro-Martin et al., 2014; IARC, 2017). Além disso, diversos estudos a longo prazo com animais de experimentação, como roedores, evidenciaram que a exposição através da dieta (alimento e água contaminados por glifosato) foi responsável por causar diversos danos ao animal como patologias renais e diferentes tipos de tumores (pulmão, fígado, mama) (IARC, 2017).



**Figura 1:** Estrutura química do glifosato (N-(fosfometil)glicina) (Fonte: IARC, 2017).



**Figura 2:** Mecanismo de ação do glifosato (N-(fosfometil)glicina) na via do ácido chiquímico, evitando a síntese de três aminoácidos essenciais para a planta (Fonte: Yamada & Castro, 2007. Adaptada de Graham & Webb, 1991).

### **1.1.2 Efeitos do glifosato em organismos não alvo**

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) a toxicidade aguda do herbicida glifosato é considerada baixa (WHO, 1994). Porém, diversos estudos evidenciaram o efeito do herbicida sobre organismos considerados não alvos em condições experimentais, principalmente organismos aquáticos (peixes e anfíbios), que demonstraram ser mais sensíveis do que mamíferos a exposição ao herbicida (Williams et al., 2000; Grisolia, 2002). Dentre eles, estudos com peixes mostraram o aumento dos níveis de glicose plasmática, indicando resposta típica ao estresse, além de alterações hepáticas em concentrações sub-letais (Langiano & Martinez, 2008). A supressão do sistema antioxidante de peixes também foi observada após a exposição ao glifosato (Lushchak et al., 2009), assim como seu efeito no metabolismo energético, na atividade de acetilcolinesterase e na resposta imune desses organismos (el-Gendy et al., 1998; Rendón-von Osten et al., 2005; Gluszczak et al., 2006; Langiano & Martinez, 2008).

Também tem se verificado em anfíbios efeitos decorrentes da exposição aos agrotóxicos, os quais estão associados ao seu declínio global (Monte & Maldonado, 2017). A exposição ao glifosato em condições experimentais evidenciou mudanças bioquímicas nestes organismos como a diminuição dos níveis de glicogênio, lipídeos e proteínas totais no fígado e músculos (Dornelles & Oliveira, 2014). Mortalidade e alterações na metamorfose também foram observados em anfíbios após exposição crônica ao herbicida (Lanctot et al., 2014; Navarro-Martin et al., 2014).

Ensaio experimentais com roedores vêm sendo utilizado com objetivo de elucidar a ação do glifosato em mamíferos. Verificou-se o efeito irreversível do herbicida nos hepatócitos e a indução de alterações histológicas do fígado, estômago, rim, cérebro, pâncreas e baço (Benedetti et al., 2004; Jasper et al., 2012; Tizhe et al., 2014). Além disso, a produção de estresse oxidativo foi observado no fígado (El-Shenawy et al., 2009) assim como alterações hematológicas com redução dos níveis de hemoglobina (Jasper et al., 2012). Contudo, o glifosato foi considerado um fraco inibidor da atividade de acetilcolinesterase em tecidos de roedores (Larsen et al., 2016).

### 1.1.3 Ação de agrotóxicos em moluscos hospedeiros intermediários

Na literatura há uma escassez de estudos acerca das implicações do uso de agrotóxicos em moluscos hospedeiros intermediários. Entretanto, alguns estudos vem sendo realizados evidenciando o efeito de agrotóxicos sintéticos, tais como os inseticidas, na atividade de colinesterases e na reprodução de moluscos do gênero *Biomphalaria*, e os herbicidas, que apresentaram efeitos nocivos celulares, fisiológicos e moleculares em *Biomphalaria alexandrina* (Kristoff et al., 2010; Kristoff et al., 2011; Abdel-Ghaffar et al., 2016).

A ação do metabólito do herbicida sintético, atrazina, também foi observada na dinâmica da relação parasito–hospedeiro com o moluscos *Stagnicola elodes*, sugerindo que a infecção simultânea por trematódeos e a exposição a contaminantes, representam uma significativa combinação de estresse para os moluscos influenciando na emergência cercariana (Koprivnikar & Walker, 2011). Em contraste, em estudo com moluscos *Biomphalaria glabrata* Say, 1818, *Helisoma trivolvis* Say, 1817, *Physa acuta* Draparnaud, 1805 e *Stagnicola elodes* Say, 1821, foi observado que a atrazina não afetou diretamente a sobrevivência, crescimento ou reprodução de qualquer espécie dos moluscos analisados, indicando que na ausência de outros possíveis estressores, os efeitos diretos das concentrações de atrazina relevantes ambientalmente podem não ser realizados ao nível de população (Gustafson et al., 2015).

Em estudo comparativo de toxicidade de moluscidas sintéticos e naturais em embriões de *B. glabrata*, foi evidenciado um potencial de letalidade maior quando os embriões foram expostos aos compostos sintéticos, embora o latex de *Euphorbia milli* tenha prejudicado o seu desenvolvimento e produzido anomalias (Oliveira-Filho et al., 2010). Além disso, os efeitos do latex de *Euphorbia splendens* var. *hislopilii* foram demonstrados sobre a atividade reprodutiva de *B. glabrata* levando a uma redução em sua população e, conseqüentemente, na transmissão de parasitos, e também no metabolismo de carboidratos e proteínas em moluscos infectados com *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, elucidando alterações em aspectos da relação parasito-hospedeiro intermediário (Mello-Silva



et al., 2007; Mello-Silva et al., 2010; Lima et al., 2012). Recentemente, foi esclarecido que além dos efeitos sobre o molusco hospedeiro, foram observadas alterações no fenótipo e no desenvolvimento do parasito adulto no hospedeiro vertebrado, após exposição de cercárias de *S. mansoni* ao latex de *E. milli* (Augusto et al., 2017).

## **1.2 *Echinostoma paraensei***

### **1.2.1 Características gerais**

Os helmintos pertencentes ao gênero *Echinostoma* Rudolphi, 1809 estão compreendidos na família Echinostomatidae Looss, 1899, que representa a maior família dentro da classe Trematoda. Possuem como principal característica a presença de um colar peristômico ou cefálico ao redor da ventosa oral, interrompido ventralmente, munido de uma ou duas fileiras de espinhos alternados. Um grupo de espinhos é observado ventralmente ao final do colar cefálico, denominados "espinhos de canto". O tamanho, o número (de 27 a 51 espinhos) e a disposição dos espinhos são caracteres de importância taxonômica tanto nas fases de cercária quanto nos espécimes adultos (Maldonado & Lanfredi, 2009; Esteban & Munoz-Antoli, 2009; Schmidt & Roberts, 2009; Toledo et al., 2014).

Equinostomas são parasitos de intestino delgado e grosso e/ou ductos biliares de um grande espectro de hospedeiros vertebrados que compreende aves, répteis e mamíferos, principalmente aqueles que utilizam o ambiente aquático para obter seus recursos alimentares. Pelo menos 24 espécies do gênero estão relacionadas a casos de equinostomíase humana endêmica no continente Asiático, principalmente na China, Índia, Coreia, Malásia, Filipinas, Taiwan e Indonésia (Huffman & Fried, 1990; Chai, 2009; Toledo & Esteban, 2016). A transmissão do parasito ocorre de forma focal e associada a práticas sócio-econômicas e culturais tais como, a ingestão de alimentos crus ou mal cozidos (moluscos, peixes, crustáceos e anfíbios) e água não tratada, nos quais as formas infectantes para o hospedeiro definitivo, as metacercárias, se encontram encistadas, sendo portanto considerada uma zoonose transmitida por alimentos e reconhecida como um problema de saúde pública (Graczyk & Fried,

1998; Fried et al., 2004; Fürst et al., 2012; Toledo & Esteban, 2012; Toledo & Esteban, 2016). Casos de infecção em humanos não são considerados uma ocorrência apenas atual, uma vez que ovos de *Echinostoma* sp. foram relatados em coprólitos de material humano mumificado ( $\pm 600-1400$  anos atrás), no Brasil e México, com suspeita de infecção por *Echinostoma paraensei* Lie & Basch, 1967 ou *Echinostoma luisreyi* Maldonado, Vieira & Lanfredi, 2003 no material recuperado no território brasileiro (Jiménez et al., 2012; Leles et al., 2014; Toledo & Esteban, 2016).

O helminto *Echinostoma paraensei* Lie & Basch, 1967 foi descrito a partir de moluscos planorbídeos *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 coletados naturalmente infectados em Belo Horizonte, Estado de Minas Gerais, Brasil, os quais foram enviados via transporte aéreo para a Califórnia, Estados Unidos, onde o ciclo de vida deste trematódeo foi estudado experimentalmente e descrito (Lie & Basch, 1967). Os moluscos *B. glabrata* atuam como o principal primeiro hospedeiro intermediário, porém o desenvolvimento das fases larvais do helminto também foram observadas em moluscos da família Physidae Fitzinger, 1833 e Lymnaeidae Rafinesque, 1815 tais como, *Physa marmorata* Guilding, 1828 e *Pseudosuccinea columella* Say, 1817, respectivamente (Lie & Basch, 1967; Maldonado et al., 2001b).

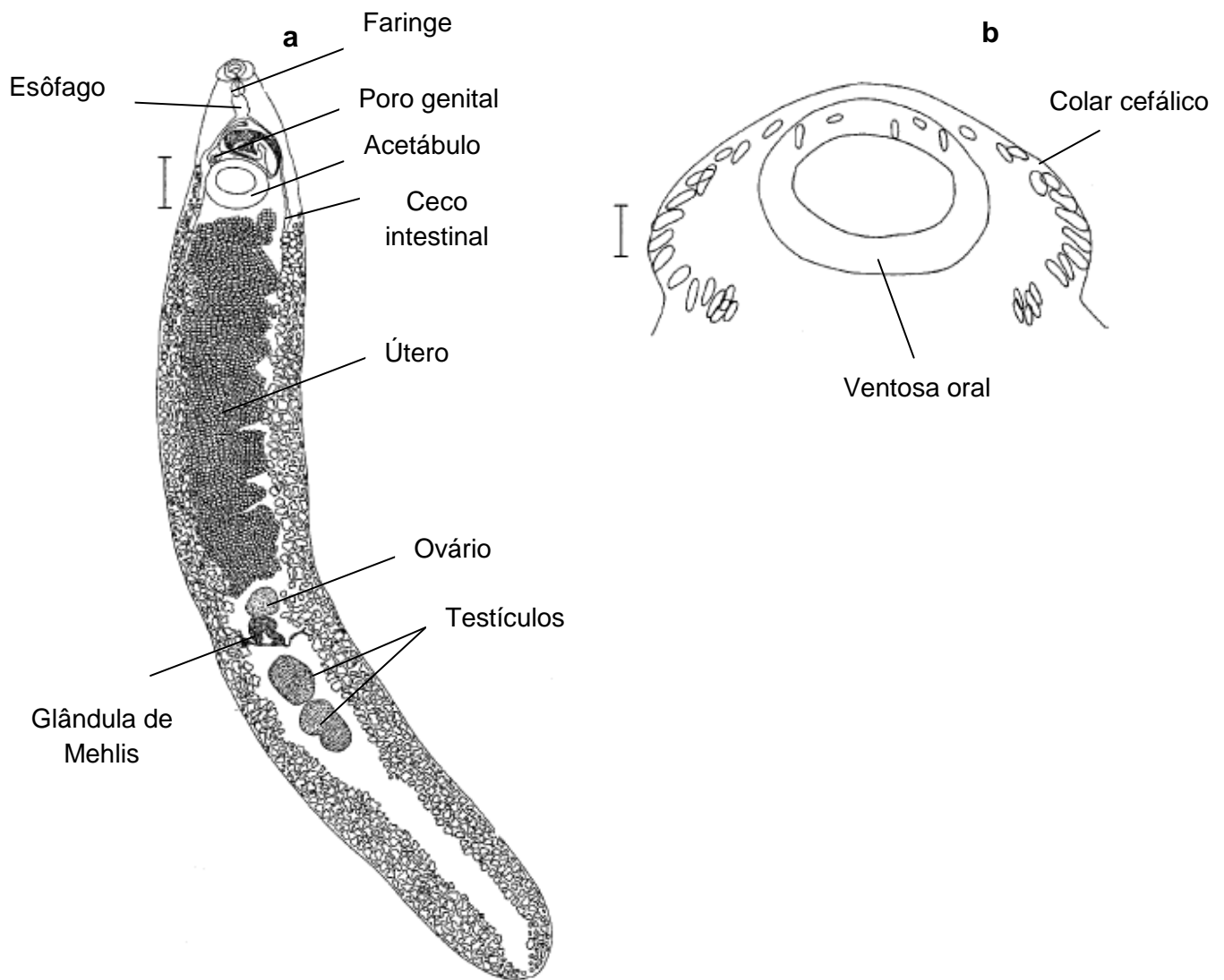
Os espécimes adultos deste trematódeo parasitam apenas mamíferos, incluindo humanos, e possuem como hospedeiro vertebrado natural o roedor de hábito semi-aquático *Nectomys squamipes* Brants, 1827 (Rodentia: Sigmondontinae) em diversas áreas da Mata Atlântica do Estado do Rio de Janeiro, Brasil (Lie & Basch, 1967; Kostadinova & Gibson, 2000; Maldonado et al., 2001a). Em condições experimentais, outros roedores se apresentaram susceptíveis a infecção por *E. paraensei* atuando como hospedeiros vertebrados, tais como, *Mesocricetus auratus* Waterhouse, 1839 (hamster) e *Mus musculus* Linnaeus, 1758 (camundongos) e *Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769 (ratos) (Lie & Basch, 1967; Maldonado et al., 2001b; Maldonado et al., 2005; Souza et al., 2011; Ferraz et al., 2012; Gonçalves et al., 2013; Souza et al., 2017).

### 1.2.2 Morfologia da forma adulta

O helminto adulto de *E. paraensei* possui corpo alongado e delgado, ampliando a partir do acetábulo em diante, e com as bordas laterais curvadas ventralmente sobre o eixo longitudinal. São pertencentes ao “grupo revolutum” apresentando 37 espinhos no colar cefálico (Georgieva et al., 2013; Georgieva et al., 2014), sendo os espinhos laterais e do canto mais longos do que os espinhos dorsais (Lie & Basch, 1967; Kostadinova & Gibson, 2000; Maldonado et al., 2001a). O arranjo dos espinhos do colar apresentam o padrão: 5 espinhos de canto em cada extremidade (3 orais e 2 aborais), uma fileira de 6 espinhos laterais em cada lado, e 15 espinhos dorsais (Lie & Basch, 1967; Maldonado et al., 2001a; Esteban & Munoz-Antoli, 2009). O colar cefálico se localiza ao redor da ventosa oral, que é subterminal. Possui pré-faringe curta e uma faringe bulbar e muscular. Apresenta esôfago longo e bifurcado anteriormente ao acetábulo, dando origem aos dois cecos intestinais, que se estendem lateralmente até a região posterior do corpo. Possui acetábulo grande e muscular, e poro genital pré-acetabular seguido de um átrio genital (Lie & Basch, 1967; Maldonado et al., 2001a). O corpo possui espinhos similares a escamas sobre o tegumento cobrindo a superfície ventral da parte anterior do corpo. Os espinhos possuem uma distribuição organizada em fila sendo mais espalhados no meio e nas bordas laterais do corpo. Neste nível, os espinhos apresentam um aspecto plano com bordas arredondadas. Não são observados espinhos na parte dorsal do corpo ou na superfície ventral, que abrange a parte anterior ao poro genital até a região posterior do acetábulo (Maldonado et al., 2001a).

Os testículos se organizam em tandem com margens lisas e sendo o testículo posterior frequentemente maior e bilobado. O saco do cirro possui formato ovóide e está localizado dorso-ventralmente ao átrio genital e acetábulo, contendo vesícula seminal, glândulas prostáticas e cirro sem espinhos. O ovário é pré-testicular de formato esférico ou ovóide. O complexo da glândula de Mehlis está localizado entre o ovário e testículo anterior, similar ao descrito para outros equinostomas (Lie, 1965; Esteban & Munoz-Antoli, 2009). Possui útero longo e sinuoso, contendo ovos operculados (tamanho aproximado de 100 µm x 60 µm), pós-acetabular e pré-ovariano, se conectando ao átrio genital através do

metratermo. Vitelino de formato folicular, extendendo-se a partir do fim do acetábulo, nos dois campos laterais, até a região posterior do corpo. O sistema excretor encontra-se localizado a partir do testículo posterior até o poro excretor subterminal (Lie & Basch, 1967; Maldonado et al., 2001a; Schmidt & Roberts, 2009; Toledo & Esteban, 2016).



**Figura 3:** *Echinostoma paraensei*. **a** Helminto adulto com 28 dias (barra=1mm) **b** Colar cefálico com espinhos (barra=100 $\mu$ m) (Fonte: Adaptado de Maldonado et al., 2001a).

### 1.2.3 Ciclo biológico de *Echinostoma paraensei*

O ciclo biológico de *E. paraensei* foi descrito detalhadamente em condições experimentais por Lie & Basch (1967), embora pouco se conhecesse sobre o ciclo em condições naturais, incluindo seu hospedeiro vertebrado natural. Maldonado et al. (2001b) descreveram o ciclo biológico de *E. paraensei* em laboratório avaliando a susceptibilidade de diferentes espécies de moluscos e roedores que podem atuar como hospedeiros intermediário e definitivo desta espécie, respectivamente. Ambos os estudos utilizaram ratos, camundongos e hamsters como hospedeiros definitivos, porém Maldonado et al. (2001b) incluíram no estudo o roedor silvestre *N. squamipes*, nascido em cativeiro, por se tratar do hospedeiro natural do parasito. Semelhantemente não obtiveram sucesso nas tentativas de infectar aves, tais como galináceos *Gallus gallus domesticus* Linnaeus, 1758 e pombos *Columba lívia* Gmelin, 1789.

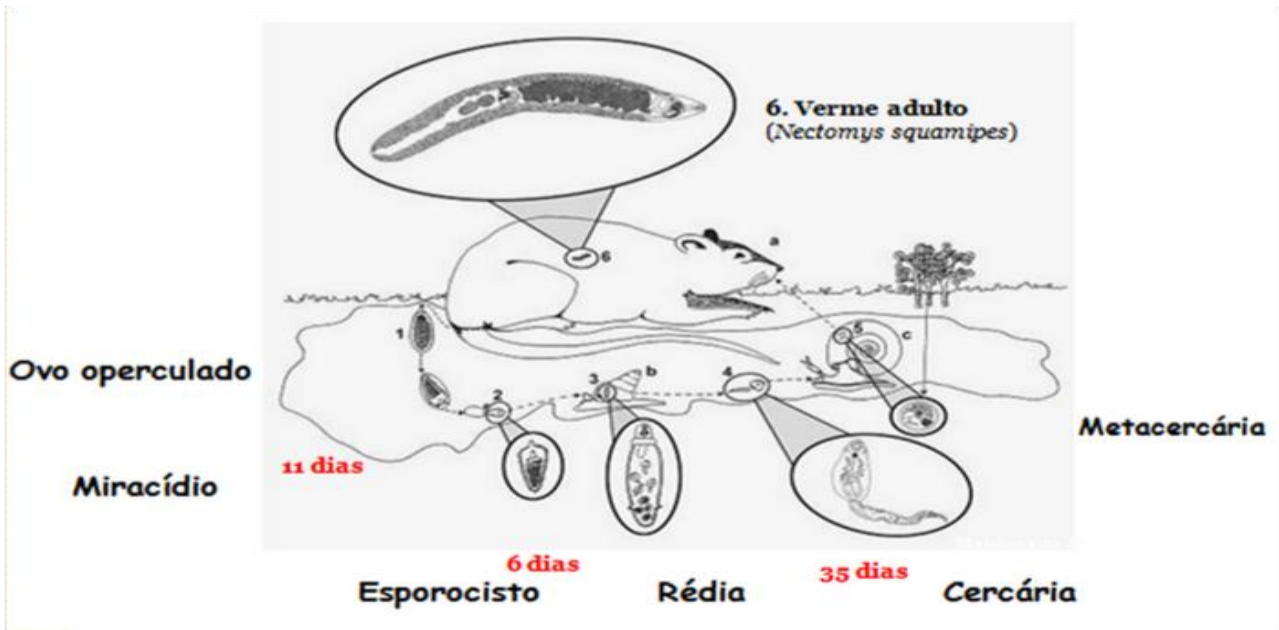
Ovos do parasito podem ser encontrados nas fezes de hamsters e camundongos entre 11 e 13 dias após a infecção e entre 14 e 16 dias, no caso de ratos (Lie & Basch, 1967). Os ovos eliminados com as fezes necessitam de condições ambientais apropriadas para que ocorra o embrionamento e a formação da fase larvar ciliada denominada miracídio. Em condições experimentais a eclosão de miracídios pode ser observada após 14 dias de permanência dos ovos em água desclorada a uma temperatura de 26-28°C (Fried & Huffman, 1996; Maldonado et al., 2001b; Garcia et al., 2011). A eclosão ocorre após o estímulo luminoso em condições naturais preferencialmente pela manhã, uma vez que os miracídios apresentam fototropismo positivo, mantendo-se ativos por várias horas. A penetração completa do miracídio no molusco (1º hospedeiro intermediário) dura em torno de 30 minutos (Lie & Basch, 1967; Maldonado et al., 2001b).

Nestes hospedeiros, a fase larvar de esporocisto se desenvolve tipicamente na cavidade ventricular (Lie & Basch, 1967; Loker & Adema, 1995). A fase larvar de rédia pode ser observada a partir do sexto dia após a penetração e são capazes de migrar por diversos órgãos. São observados dois tipos de rédias maduras, que podem ser diferenciadas pelo tamanho da faringe (grande ou

pequena). A fase larvar de cercária apresenta uma cauda simples e com presença de dobras dorsais, ventrais e latero-ventrais em formato de barbatana. Possuem fototropismo negativo, podendo ser liberadas do molusco a partir do 25º dia após a infecção e vivem por cerca de 6 horas na ausência do 2º hospedeiro intermediário (Lie & Basch, 1967; Maldonado et al., 2001b).

Ao penetrar no 2º hospedeiro intermediário, que pode ser moluscos, anfíbios, peixes ou crustáceos, as cercárias perdem a cauda e dão a origem a forma encistada de metacercária (cistos), que é a forma infectante para o hospedeiro vertebrado. A metacercária é esférica possuindo duas paredes císticas, uma parede externa transparente e uma parede interna opaca. Os cistos se localizam na região pericárdica ou renal dos moluscos *B. glabrata* e podem ser observados quatro dias após a infecção (Lie & Basch, 1967; Maldonado et al., 2001b; Souza et al., 2013).

Os hospedeiros vertebrados definitivos se tornam infectados após ingerirem o 2º hospedeiro intermediário contendo metacercárias. No intestino delgado desses mamíferos, normalmente no íleo, ocorre o desencistamento das metacercárias com a liberação do helminto jovem que migra e se estabelece no duodeno, com auxílio das ventosas, cerca de quatro horas após a ingestão das metacercárias (Maldonado et al., 2005). O helminto jovem amadurece gradualmente e em torno de 15 dias pós-infecção já se observa o helminto adulto com ovos sendo eliminados nas fezes do hospedeiro (Esteban & Muñoz-Antoli, 2009).



**Figura 4:** Ciclo biológico de *Echinostoma paraensei* (Fonte: LABPMR, 2001).

#### 1.2.4 *Echinostoma paraensei* como modelo experimental

Espécies do gênero *Echinostoma* começaram a ser utilizadas como modelos experimentais no início do século XXI, por serem helmintos de fácil manutenção em laboratório, tanto nos estádios larvais quanto adulto. Por esta razão, equinostomas vem sendo utilizados como bons modelos experimentais por décadas no que diz respeito ao processo envolvido no desencistamento de metacercárias e cultivo *in vitro*, comportamento reprodutivo e vários aspectos do reconhecimento e interação parasito-hospedeiro (Maldonado et al., 2001b; Garcia et al., 2011; Tunholi et al., 2011a; Tunholi et al., 2011b; Garcia et al., 2012; Souza et al., 2013). Equinostomas tem contribuído para o desenvolvimento na área de sistemática, bioquímica, ultraestrutura, imunologia, biologia molecular, fisiologia, entre outras (Fried & Graczyk, 2000; Kostadinova, 2009; Toledo et al., 2014).

Diversos estudos vêm sendo conduzidos com *E. paraensei* em laboratório desde que Lie & Basch (1967) o descreveram, principalmente com relação as

interações parasito-hospedeiro invertebrado (moluscos) (Loker et al., 1986; Loker & Hertel, 1987; Sapp & Loker, 2000). Em 2001, a descrição de um novo isolado de *E. paraensei*, coletado em *N. squamipes* naturalmente infectados no município de Sumidouro, Rio de Janeiro, Brasil, possibilitou a manutenção do ciclo de vida deste helminto em condições laboratoriais, e conseqüentemente, o desenvolvimento de diversos estudos acerca da variabilidade intraespecífica deste trematódeo no Brasil (Maldonado et al., 2001a; Maldonado et al., 2001b).

Os estudos morfológicos dos estádios larvais de miracídio, rédia e cercária, utilizando microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura e transmissão, elucidaram diferentes características auxiliando no estudo taxônomico e de sistemática desse helminto (Pinheiro et al., 2004a; Pinheiro et al., 2004b; Pinheiro et al., 2005; Matos et al., 2018). A variação biológica entre dois isolados geográficos de *E. paraensei*, de Rio de Janeiro e Belo Horizonte, foi demonstrada em condições experimentais (Maldonado et al., 2005), assim como as alterações fisiológicas e bioquímicas no hospedeiro intermediário (molusco) frente a infecção por este trematódeo (Pinheiro et al., 2009).

Mais recentemente, os efeitos morfológicos e ultraestruturais em *E. paraensei* resultantes da exposição ao antihelmíntico Praziquantel foram elucidados *in vivo* (Ferraz et al., 2012; Gonçalves et al., 2013), assim como a descrição do fenômeno do desencistamento *in vitro* de metacercárias deste trematódeo (Souza et al., 2013). O potencial antihelmíntico de extratos de artesunato, composto derivado da artemisina com potencial anti-parasitário, também foi demonstrado através de alterações morfológicas evidenciadas nas larvas recém-desencistadas de *E. paraensei* após exposição *in vitro*, sendo considerado um fármaco alternativo para o tratamento de doenças causadas por trematódeos (Souza et al., 2017).



## 2. Justificativa

O trematódeo intestinal, *E. paraensei*, vem sendo utilizado por nosso grupo de pesquisa, como modelo de estudo visando elucidar diversos aspectos da relação parasito-hospedeiro que incluem os hospedeiros definitivo e intermediário (Maldonado et al., 2001a; Maldonado et al., 2001b; Pinheiro et al., 2009; Garcia et al., 2011; Garcia et al., 2012). Ensaios *in vivo* para triagem de fármacos já disponíveis comercialmente, com potencial anti-helmíntico, e esclarecimento dos mecanismos de ação e alterações morfológicas decorrentes do seu uso foram realizados com este trematódeo (Ferraz et al., 2012; Gonçalves et al., 2013), bem como ensaios *in vitro* a fim de esclarecer os processos envolvidos no fenômeno de desencistamento das formas larvais de metacercária (Souza et al., 2013) e para análise de alterações morfológicas em larvas tratadas com diferentes fármacos com potencial anti-helmíntico (Souza et al., 2017). Estes estudos consubstanciam nosso conhecimento a cerca do helminto parasito *E. paraensei*.

O uso de agrotóxicos é uma questão preocupante tanto para saúde humana quanto ambiental, uma vez que pode contaminar a água, o solo e os alimentos (Solomon et al., 1996). Herbicidas liberados no ambiente podem atuar sobre diferentes estádios do ciclo biológico de helmintos, determinando alterações na dinâmica de transmissão desses parasitos. Entretanto, pouco se sabe sobre os efeitos de agrotóxicos nestes organismos (Monte & Maldonado, 2017). O helminto *E. paraensei* apresenta no seu ciclo biológico estádios de vida livre dependentes dos ecossistemas aquáticos, onde o herbicida glifosato pode ser encontrado devido a sua elevada solubilidade em água (Amarante Júnior et al., 2002). Além disso, o hospedeiro vertebrado e invertebrado natural do parasito, o roedor semi-aquático *N. squamipes* e o molusco *B. glabrata*, encontram-se expostos ao herbicida e aos seus produtos de degradação, em áreas agrícolas com uso intensivo do herbicida, o que torna o helminto adulto e suas formas de desenvolvimento alvos de sua ação. Portanto, constatado que o herbicida glifosato tem mostrado diversos efeitos sobre organismos animais, diferente dos preconizados para sua ação, postulamos que a exposição do trematódeo parasito *E. paraensei* ao herbicida Roundup® Original resulte em alterações biológicas e morfológicas que possam influenciar na sua transmissão.

## **3. Objetivos**

### **3.1 Objetivo Geral**

Analisar experimentalmente o efeito do herbicida Roundup® Original sobre o ciclo de vida do trematódeo *Echinostoma paraensei*.

### **3.2 Objetivos Específicos**

- Discutir a interface dos agrotóxicos em helmintos destacando principalmente como esses compostos influenciam no parasitismo e ambiente.
- Verificar a mortalidade e as alterações biológicas dos estádios de ovo, miracídio, cercária, metacercária, larva recém desencistada, helminto jovem e adulto de *E. paraensei*, após exposição a diferentes concentrações do herbicida Roundup® Original.
- Investigar os efeitos morfológicos nas fases de larva recém desencistada, helminto jovem e adulto, após exposição a diferentes concentrações do herbicida Roundup® Original.
- Analisar os efeitos sobre o sistema interno de defesa do hospedeiro intermediário (molusco), no curso da infecção, após exposição a diferentes concentrações do herbicida Roundup® Original.

## CAPÍTULO I

### O QUE SABEMOS SOBRE OS EFEITOS DE AGROTÓXICOS EM HELMINTOS?

Monte TCC, Maldonado A. What do we know about the effects of pesticides on helminths? *JSM Biol* 2017; 2(1):1008. (Anexo I).

## 1. INTRODUÇÃO

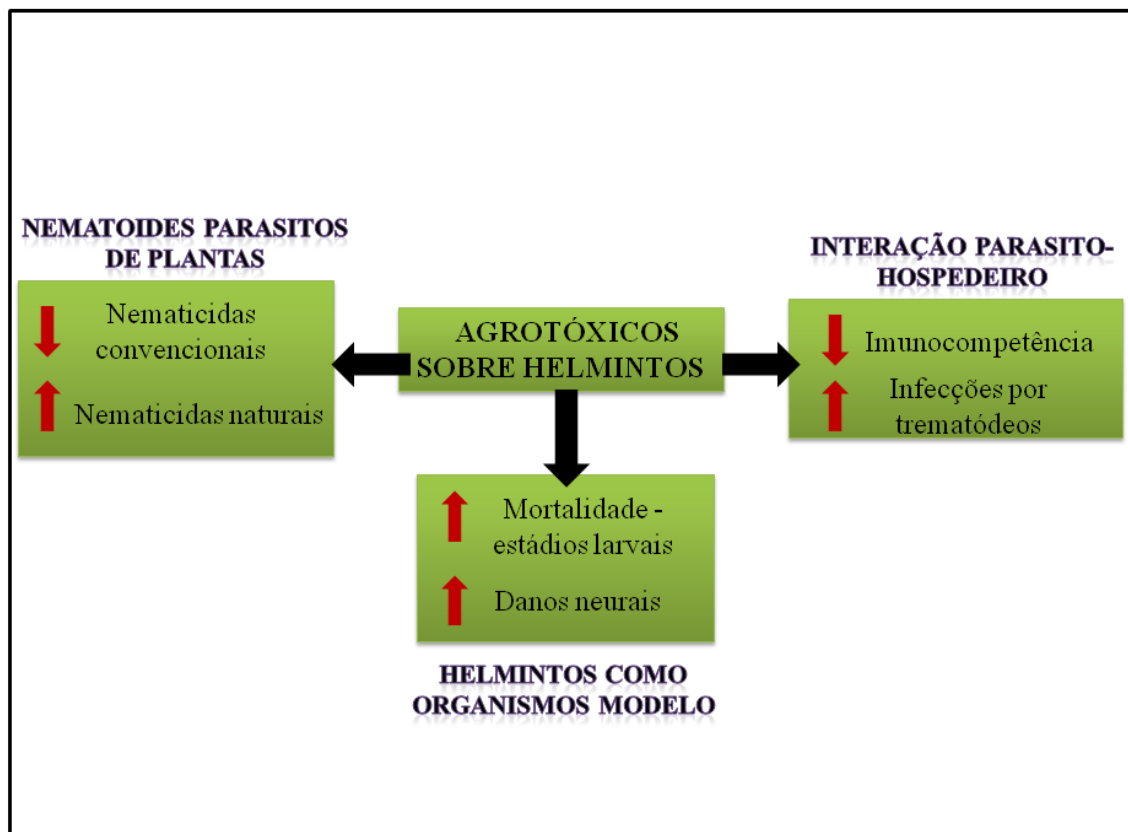
O termo agrotóxico refere-se a compostos utilizados para controlar pragas e/ou promover a produção agrícola. Entre as principais classes estão inseticidas, herbicidas, fungicidas, moluscicidas, rodenticidas e nematicidas. Entre esses, inseticidas organoclorados foram usados com êxito para controlar uma série de doenças, como a malária, até a década de 1960, quando foram banidos devido a efeitos colaterais nocivos, como a decomposição lenta (alta persistência no ambiente), degradação ambiental, baixa solubilidade em água, alta solubilidade em meios sensíveis a compostos orgânicos, como os tecidos adiposos de organismos vivos, e alta toxicidade para insetos e humanos (Aktar et al., 2009; Jardim et al., 2009). A partir da década de 1960 até os anos 1980, observa-se a introdução de inseticidas organofosforados, carbamatos e piretróides, bem como ao parecimento de novos herbicidas e fungicidas, a partir dos anos 1970 (Aktar et al., 2009). De acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos EUA (APA) os gastos com herbicidas representam a maior parcela das despesas totais em agrotóxicos (40%), seguidos de inseticidas, fungicidas e outros agrotóxicos, respectivamente (Grube et al., 2011).

É aceito que o uso de agrotóxicos aumenta a produção de alimentos e reduz doenças transmitidas por vetores. No entanto, sérias implicações para saúde dos seres humanos e do meio ambiente também resultam do seu uso. Os grupos com maior risco de exposição aos agrotóxicos são trabalhadores agrícolas, particularmente os envolvidos na formulação, mistura, transporte e pulverização. Contudo, nenhum segmento da população está completamente protegido contra exposição e os efeitos potencialmente graves para a saúde, particularmente nos países em desenvolvimento. As estimativas são que as doenças crônicas causadas pela exposição a agrotóxicos afetam cerca de 1 milhão de pessoas por ano em todo o mundo (Leng et al., 1995; WHO, 1990)

Além da saúde humana, esses compostos contaminam o solo, a água e a vegetação e são tóxicos para muitos organismos, incluindo insetos, aves, peixes de importância econômica e plantas não-alvos (Aktar et al., 2009). Nos últimos anos, tem sido constatado o efeito do uso de agrotóxicos na vida silvestre,

principalmente as relacionadas a contaminantes que afetam as interações hospedeiro-patógeno. Estes efeitos também estão associados a modificações nos potenciais de interação (infectividade) entre hospedeiros e patógenos, causando perda da biodiversidade e afetando a transmissão dos parasitos (Bradley & Altizer, 2007; Lehrer et al., 2010; Koprivnikar et al., 2012).

Esta mini revisão examina os efeitos dos agrotóxicos em helmintos, com foco na interação parasito-hospedeiro, particularmente nos estádios de vida livre de trematódeos (miracídio e cercárias), em helmintos utilizados como modelos experimentais e nematoides parasitas de plantas, para elucidar os efeitos sobre a biologia destes parasitos, resumindo os principais compostos estudados que podem influenciar a transmissão desses helmintos (Figura 1).



**Figura 1:** Os principais aspectos de agrotóxicos sobre helmintos (Monte & Maldonado, 2017)

## 2. EFEITOS DE AGROTÓXICOS SOBRE O PARASITISMO

A transmissão de parasitos é fortemente influenciada por mudanças no meio ambiente, que podem alterar interações específicas de hospedeiros, parasitos, fatores bióticos e abióticos (Lafferty & Kuris, 1999; Rohr et al., 2008a). De acordo com Bolker et al. (2003), os fatores decorrentes do uso de agrotóxicos que afetam a ecologia do hospedeiro e parasito podem ser classificados em letais e subletais. Enquanto os fatores letais reduzem a densidade de hospedeiros e/ou parasitos, fatores subletais alteram a imunidade do hospedeiro e/ou a infectividade parasitária, alterando conseqüentemente a dinâmica da transmissão da doença. Esses fatores antropogênicos, como o uso de agrotóxicos, podem ter efeitos positivos ou negativos na transmissão do parasito, tornando necessário compreender e quantificar seus efeitos sobre a emergência de doenças (Rohr et al., 2008a; Rohr et al., 2008b).

Os efeitos mais evidentes são as mudanças nas taxas de sobrevivência e características de hospedeiros e parasitos, como susceptibilidade e infectividade. A maioria das pesquisas concentra-se na interação parasito-anfíbio expostos a agrotóxicos, devido ao declínio global deste hospedeiro (Daszak et al., 2003; Pounds et al., 2006; Rohr et al., 2008a). Além disso, o parasitismo de anfíbios por algumas espécies de trematódeos tem recebido maior atenção em decorrência de serem considerados parasitos emergentes, capazes de causar deformidades dos membros superiores e inferiores impulsionadas por mudanças ambientais antropogênicas (Kiesecker, 2002; Johnson & Sutherland, 2003; Skelly et al., 2006; Rohr et al., 2008a; Rohr et al., 2008b). Portanto, os agrotóxicos estão entre os fatores que afetam a prevalência e intensidade da doença e são considerados diretamente tóxicos para hospedeiros e estádios de vida livre de parasitos, alterando seu comportamento e imunidade, afetando a transmissão do parasito e a virulência (Rohr et al., 2003; Rohr et al., 2004; Relyea & Hoverman, 2006; Rohr et al., 2008a; Rohr et al., 2008b; Rohr & Palmer, 2005; Monte et al., 2016).

O herbicida atrazina tem sido investigado em diferentes estudos de interação anfíbio-trematódeo com o propósito de avaliar o seu papel como desencadeador do risco de doença (Koprivnikar et al., 2007; Rohr et al., 2008a;

Rohr et al., 2008b). Acredita-se que a atrazina aumenta a fonte de alimento dos gastrópodes (1° hospedeiro intermediário de trematódeos), conseqüentemente aumentando a abundância de cercárias e a exposição de anfíbios a infecção (Brock et al., 2000; Rohr et al., 2008b). Kiesecker et al. (2002) demonstraram em experimentos de campo e laboratório que a infecção por trematódeo explica o desenvolvimento de deformidades dos membros de anfíbios. A exposição a agrotóxicos, como atrazina, malathion e esfenvalerato, em áreas de escoamento agrícola foi relacionada com a diminuição da imunocompetência do hospedeiro, resultando em maiores cargas parasitárias e deformidades dos membros.

Em um estudo experimental realizado por Rohr et al. (2008a), avaliando o efeito de dois herbicidas (atrazina e o glifosato) e dois inseticidas (malathion e o carbaryl) em seis mecanismos importantes da interação parasito-hospedeiro (sobrevivência cercariana, sobrevivência do anfíbio, sobrevivência de moluscos, crescimento e fecundidade de moluscos, infectividade cercariana, e susceptibilidade ao anfíbio) e usando o trematódeo *Echinostoma trivolvis* com seu 1° e 2° hospedeiro intermediário, o molusco *Planorbella trivolvis* e o anfíbio *Rana clamitans* (rã verde), respectivamente, observaram que apenas a atrazina reduziu significativamente a sobrevivência de cercárias em concentrações maiores que as encontradas em ecossistemas aquáticos. Não foi encontrada evidência de que os tratamentos com agrotóxico afetaram significativamente características do 1° hospedeiro intermediário nas condições testadas. No entanto, a exposição subletal de *R. clamitans* a cada um dos quatro agrotóxicos aumentou sua susceptibilidade a infecção, sugerindo um impacto negativo dos agrotóxicos na imunidade do 2° hospedeiro intermediário, contribuindo para o aumento das frequências de infecções causadas por trematódeos em anfíbios, o que poderia ser um dos fatores que levam ao declínio da população.

A sobrevivência dos parasitos depende da transmissão bem-sucedida de estádios infectantes para os hospedeiros. Os estádios de trematódeos de vida livre (miracídio e cercária), enfrentam desafios como a predação, a necessidade de encontrar fatores ambientais internos e externos adequados em seus macrohabitats (Pietroock & Marcogliese, 2003; Koprivnikar et al., 2006). Fatores abióticos (temperatura, conteúdo de oxigênio e pH) e atividades antropogênicas

podem influenciar a ocorrência desses organismos, afetando as infecções por trematódeos. Vários estudos foram conduzidos sobre a influência de poluentes, especialmente metais pesados, na sensibilidade cercariana (Morley et al., 2001; Pietrock et al., 2002; Morley et al., 2003). Os agrotóxicos também demonstraram ter efeitos deletérios sobre miracídeos e cercárias, como observado com moluscidas (Ghandour & Webbe, 1975; Viyanant et al., 1982; Tchounwou et al., 1992) e inseticidas diclorodifeniltricloroetano (DDT) (Kuntz & Stirewalt, 1946).

Koprivnikar et al. (2006), mostrou em condições experimentais os efeitos da atrazina nas cercárias de quatro diferentes espécies de trematódeos: *Haematoloechus* sp., *Alaria* sp., *Megalodiscus* sp. e *E. trivolvis*. Os autores demonstraram que a mortalidade e a atividade das cercárias variaram entre as espécies após a exposição à atrazina resultando em diminuição da capacidade de *E. trivolvis* infectar anfíbios, bem como na intensidade da infecção. Mais recentemente, Raffel et al. (2009), não encontraram nenhuma evidência de efeitos biológicos quando ovos e miracídeos de *E. trivolvis* foram expostos aos quatro agrotóxicos citados acima, incluindo atrazina e o glifosato em altas concentrações (Rohr et al., 2008a). Concluíram que cercárias sejam mais sensíveis aos produtos testados atribuído ao fato dessas larvas apresentarem maior tempo de vida e consequente prolongamento do tempo de exposição.

### **3. EFEITOS DE AGROTÓXICOS SOBRE HELMINTOS UTILIZADOS COMO ORGANISMOS MODELO**

Algumas espécies de helmintos foram utilizadas ao longo dos anos como organismos modelo em condições de laboratório para diferentes fins, tais como ensaios *in vitro* e *in vivo* visando esclarecer a ação dos principais fármacos com atuação antihelmíntica (Ferraz et al., 2012; Gonçalves et al., 2013). Entre estas relacionam-se espécies do gênero *Echinostoma*, principalmente *E. paraensei* e *E. caproni* (Maldonado et al., 2001b; Garcia et al., 2011; Panic et al., 2013; Souza et al., 2013; Monte et al., 2016; Souza et al., 2017). A sua adoção como modelo decorre, em parte, do fato de que seu ciclo de vida é fácil de reproduzir em condições laboratoriais, exigindo baixos custos de equipamentos e manutenção (Fried, 2000; Maldonado et al., 2005). O foco de pesquisa mais comum está



relacionado aos efeitos biológicos dos agrotóxicos nos estádios larvais dos trematódeos, uma vez que esses requerem o ambiente aquático para completar seu ciclo de vida, o que significa maior exposição aos contaminantes (Koprivnikar et al., 2006; Raffel et al., 2009 Monte et al., 2016). O nematoide de vida livre *Caenorhabditis elegans* emergiu como um importante organismo modelo na pesquisa de toxicologia aquática e de solo, especialmente para avaliação de toxicidade ambiental de áreas urbanas onde a qualidade da água está ameaçada por atividades agrícolas, esgoto e efluentes industriais (Clavijo et al., 2016). Além disso, uma vez que *C. elegans* é um nematoide de solo, seu uso como organismo modelo também pode ajudar a elucidar os efeitos de vários agrotóxicos usados para controle dos fitonematoides.

Conceitualmente, um agrotóxico ideal deve ter a capacidade de exterminar uma única praga alvo sem prejudicar organismos não-alvo, incluindo estádios de vida livre de trematódeos. Recentemente, Monte et al. (2016), mostrou o efeito da formulação comercial do herbicida glifosato, Roundup®, em diferentes estádios de desenvolvimento do trematódeo *E. paraensei*, tanto *in vitro* como *in vivo*, usando concentrações abaixo da recomendada para o uso pelo fabricante. Neste estudo, foi possível observar que todas as etapas (ovos, miracídios, cercárias, larvas recém-desencistadas e helmintos adultos) apresentaram mortalidade dependente da concentração quando expostas ao Roundup® em condições experimentais, destacando a possibilidade de interferência do herbicida na dinâmica de transmissão desse parasito.

As etapas de miracídio e cercária, que necessitam de ambiente aquático para alcançar o hospedeiro intermediário, apresentaram alta mortalidade quando exposto ao Roundup® *in vitro*, particularmente o estágio de miracídio. Isso pode estar relacionado ao fato de que as cercárias são cobertas por glicocalix, que cobre o tegumento e pode atuar como uma barreira física para o Roundup® (Dorsey et al., 2002), enquanto os miracídios apresentam placas epidérmicas com espaços interepidérmicos, que podem facilitar a penetração do herbicida (Pinheiro et al., 2004). Também foi sugerido que o herbicida influencia o sistema neuromuscular e o metabolismo energético desses estádios larvais, afetando o sucesso da transmissão. Da mesma forma, os helmintos adultos apresentaram

mortalidade dependente da concentração, que pode estar associado ao possível dano celular causado pelo surfactante POEA, que tem se mostrado mais tóxico do que o ingrediente ativo glifosato (Adam et al., 1997; Tsui & Chu, 2003; Benachour & Séralini, 2009; Mesnage et al., 2013).

Os efeitos neurodegenerativos causados por herbicidas contendo glifosato e fungicidas contendo magnésio foram observados por Negga et al. (2011; 2012), usando o nematoide *C. elegans* como um organismo modelo. Analisando a relação do uso de agrotóxicos e a incidência da doença de Parkinson observaram uma redução no número de neurônios devido à exposição crônica. McVey et al. (2016), também investigaram em *C. elegans*, expostos ao herbicida glifosato, as taxas de eclosão na fase do ovo, e mostraram o desenvolvimento neurológico anormal após a eclosão. Os resultados indicaram diminuição estatisticamente significativa no número de neurônios e o aumento dos níveis de superóxido, sugerindo que a exposição precoce ao herbicida pode prejudicar o desenvolvimento neuronal de helmintos e também que a exposição a substâncias tóxicas como os agrotóxicos durante o desenvolvimento pode fazer com que indivíduos sejam suscetíveis a doenças neurodegenerativas mais tardiamente na vida.

Uma estratégia interessante para avaliar a toxicidade de ingredientes ativos em helmintos seria realizar testes *in vitro* comparando os efeitos do ingrediente ativo apenas e a sua formulação comercial, a fim de analisar a possibilidade de redução de danos aos organismos não-alvos.

#### **4. EFEITOS EM NEMATOIDES PARASITOS DE PLANTAS**

Os nematoides parasitos de planta são pequenos patógenos transmitidos pelo solo responsável por causar danos nas culturas agrícolas, com perdas estimadas de US\$ 80 bilhões por ano (Nicol et al., 2011). Estima-se existirem mais de 4.100 espécies de nematoides parasitos, apresentando uma variedade de interações com seus hospedeiros. Esses helmintos podem atuar como ectoparasitos migratórios, endoparasitos migratórios ou nematoides semi-

endoparasitos (Jones et al., 2013). Os mais importantes economicamente são os nematoides de cisto e "*root-knot*", que são biotróficos e equipados com estruturas de alimentação complexas que são introduzidas nas raízes de seu hospedeiro, permitindo que eles tenham uma fonte de alimento variada e duradoura (Van Megan et al., 2009). Ao longo dos anos, alguns produtos químicos foram empregados para controlar esses nematoides, especialmente nematicidas fumigantes (brometo de metilo), mas os seus usos foram restringidos por serem nocivos ao meio ambiente e organismos não-alvos (Giannakou et al., 2002; Zasada et al., 2010).

O "*root-knot*" *Meloidogyne incognita* é o nematóide parasito de plantas mais importante e pode atacar mais de 3.000 culturas agrícolas, resultando em perdas econômicas significativas. Cheng et al. (2015), testaram o efeito biológico do inseticida benzoato de emamectina, que é derivado naturalmente de moléculas de avermectina isoladas da bactéria do solo *Streptomyces avermitilis*, sobre o manejo de *M. incognita* em laboratório, estufa e campo. Em todos, benzoato de emamectina apresentou boa eficácia contra *M. incognita* sem danificar o crescimento das plantas. Mais recentemente, Martins & Santos (2016), analisaram o efeito nematicida de diferentes extratos de plantas em *M. incognita*. Observaram propriedades nematicidas para o capim citronela e extratos de hortelã (70%) e elevada mortalidade total com extratos de agrião. Após a exposição, as larvas que permaneceram ativas foram inoculadas em mudas de tomate para avaliar sua infectividade, e o efeito tóxico desses extratos sobre os nematoides parasitos foi confirmado.

Uma alternativa para substituir nematicidas sintéticos é o uso de plantas ou seus metabólitos secundários como fontes de extratos nematicidas. Os alcaloides 1,2-desidropirrolizidina (PAs) são um grupo de metabólitos secundários de plantas que possuem a função de protegê-las repelindo vertebrados, insetos, moluscos e até mesmo nematoides transmitidos pelo solo. Entretanto, alguns estudos demonstraram que os helmintos não são repelidos mas que as plantas podem suprimir sua reprodução (Mattocks, 1968; Dreyer et al., 1985; Rizk, 1991; Speiser et al., 1992; Hare & Eisner, 1993; Van Dam et al., 1995; Van der Putteen et al., 1998; Narberhaus et al., 2005; Dominguez et al., 2008; Thoden et al., 2009a;

Thoden et al., 2009b). Thoden et al. (2009a), mostraram uma redução significativa do nematoide *Meloidogyne hapla* em solos infestados através de cultivo e incorporação de plantas que produzem PAs. Além disso, Thoden et al. (2009b), demonstraram os efeitos desses metabólitos sobre o desenvolvimento de nematoides parasitos de plantas e de vida livre. Os resultados mostraram os efeitos ovicidas, nematicidas e repelentes induzidos pelas PAs em diferentes espécies de nematoides e essa toxicidade relacionada as diferentes classes de alcalóides. Os autores sugerem serem estes metabólitos promissores alternativas para controle de nematoides.

A busca de medidas de controle alternativas visando substituir nematicidas convencionais é uma preocupação global, justificando a pesquisa de substâncias naturais de baixa toxicidade ambiental (Franzener et al., 2007; Stangarlin et al., 2008; Carboni et al., 2013; Martins et al., 2016).

## **5. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO**

Perturbações ambientais, como a contaminação causada por agrotóxicos, têm diversos efeitos tanto para os seres humanos como para o meio ambiente. Poucas pesquisas têm sido realizadas acerca dos efeitos desses agentes químicos em helmintos. O que se observa são investigações direcionadas principalmente a outros organismos considerados expostos a agrotóxicos, como aves, peixes e anfíbios (Benachour et al., 2007; Lushchark et al., 2009; Koprivnikar et al., 2010; Hock & Poulin, 2012; Navarro-Martin et al., 2014; Lanctôt et al., 2014). Os efeitos de herbicidas à base de glifosato na sobrevivência, desenvolvimento, proporção de sexos e crescimento de anfíbios em condições de laboratório foram investigados por Navarro-Martín et al. (2014), e Lanctôt et al. (2014), demonstrando a influência desses produtos químicos na metamorfose desses animais alterando os perfis de genes do mRNA, e que sugere alteração na imunidade do hospedeiro além de outros fatores biológicos capazes de comprometer a interação parasito-hospedeiro e contribuir para o declínio da população de anfíbios.

O uso de helmintos em condições experimentais têm sido relevante, pois possibilita esclarecer os efeitos fisiológicos, biológicos e morfológicos causados por agrotóxicos sobre esses organismos. Esses estudos tem sido direcionados para a elucidação das alterações promovidas pelos agrotóxicos sobre aspectos da biologia dos estádios larvais de trematódeos (Koprivnikar et al., 2006; Raffel et al., 2009; Monte et al., 2016) e de fitonematoides (Carboni et al., 2013; Martins & Santos, 2016; Cheng et al., 2015). Neste último, tem-se como objetivo a obtenção do controle/manejo alternativo usando PAs, que são menos tóxicos para o meio ambiente do que os compostos sintéticos. Os efeitos repelentes causados por PAs foram observados por Thoden et al. (2009b), para os nematoides adultos de *Rhabditis*, mas não se observou repelência em juvenis de *M. incognita*. Além disso, as formas juvenis de *M. hapla* não conseguiram completar seu ciclo de vida ou sua reprodução foi reduzida quando as plantas produtoras de PA foram infestadas por esta espécie, afetando também a interação parasito-hospedeiro (Thoden et al., 2009a). Esses achados fornecem evidências adicionais de que as diferenças na susceptibilidade estão fortemente relacionadas a diferentes espécies parasitas e formas químicas de PAs. Os estádios adultos dos helmintos têm grande valor, pois podem mostrar os impactos fisiológicos e ultraestruturais dos agrotóxicos, como a nível nervoso e celular, que também poderiam contribuir para o controle/manejo desses parasitos ao descobrir o modo de ação dessas substâncias ou elucidando a possível interferência na dinâmica de transmissão de helmintos.

Esta mini revisão discutiu a interface dos helmintos e agrotóxicos, destacando como esses compostos podem atuar na interação biológica, particularmente trematódeos parasitos, nematoides do solo de vida livre e nematoides parasitos. É importante realizar estudos para proposição de novas estratégias que minimizem os efeitos tóxicos dos compostos atualmente utilizados, focando em mecanismos de ação específicos sobre os organismos-alvo e esclarecer a relevância na transmissão dos helmintos.

## CAPÍTULO II

### **EFEITOS *IN VIVO* E *IN VITRO* DO HERBICIDA ROUNDUP® SOBRE OS ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO DO TREMATÓDEO *Echinostoma paraensei***

Monte TCC, Garcia J, Gentile R, Vasconcellos MC, Souza J, Braga BV, Maldonado A. *In vivo* and *in vitro* effects of the herbicide Roundup on developmental stages of the trematode *Echinostoma paraensei*. *Exp Parasitol* 2016; 169:43-50. (Anexo II).

## 1. INTRODUÇÃO

O uso de agrotóxicos na agricultura é motivo de preocupação devido a seu impacto no ambiente e saúde humana, já que eles podem contaminar água, solo e alimentos, particularmente devido à persistência de resíduos no ambiente e uso extensivo (Solomon et al., 1996). Entre os herbicidas convencionais, o mais comercializado mundialmente e no Brasil é o glifosato (ANVISA; UFPR, 2012; IBAMA, 2010). Desde 2008, o Brasil tem sido o maior consumidor de agrotóxicos do mundo, e os herbicidas são a classe mais comumente utilizada (Carneiro et al., 2012).

Glifosato, N-(fosfonometil) glicina, é um herbicida não seletivo e pós-emergente que atua no sistema enzimático de plantas, inibindo a via essencial do ácido chiquímico, que está envolvido no metabolismo de aminoácidos (Amarante Júnior et al., 2002; Schonbrunn et al., 2001). No Brasil, o glifosato é formulado como um sal de isopropilamina e juntamente com o surfactante taloamina polietoxilato (POEA) (Lanctôt et al., 2014; Navarro-Martín et al., 2014) compõe a formulação comercial Roundup®. A exposição de animais silvestres e humanos a resíduos de Roundup® através de práticas agrícolas ou da cadeia alimentar tem sido relatada, uma vez que o herbicida foi encontrado em concentrações mensuráveis em rios (Acquavella et al., 2004; Takahashi et al., 2001). Estudos *in vivo* que empregam moluscos, peixes, anfíbios e ratos (Cattani et al., 2014; Hock and Poulin, 2012; Lanctôt et al., 2014; Lushchark et al., 2009; Navarro-Martin et al., 2014) e estudos *in vitro* em humanos e células animais (Benachour et al., 2007; Clair et al., 2012), tem sido conduzidos para avaliação da toxicidade deste herbicida.

Há pouco conhecimento sobre os efeitos dos agrotóxicos em helmintos parasitos, particularmente aqueles cujo ciclo de vida está relacionado a ecossistemas aquáticos. *E. paraensei* é um tremátodeo intestinal que foi isolado de moluscos *B. glabrata* naturalmente infectados no estado de Minas Gerais, Brasil (Lie & Basch, 1967) e seu hospedeiro definitivo natural é o roedor de hábito semi-aquático, *N. squamipes* (Maldonado et al., 2001a), que possui ampla distribuição geográfica ao longo do bioma da Mata Atlântica no Brasil (Bonvicino et al., 2008). Este helminto tem sido usado como um organismo modelo para

elucidar vários aspectos da relação parasito-hospedeiro (Garcia et al., 2011, 2012; Maldonado et al., 2001a; Maldonado et al., 2001b; Pinheiro et al., 2009). Mais recentemente, o uso de ensaios *in vitro* com *E. paraensei* mostrou-se promissor para esclarecer os processos envolvidos no fenômeno do metabolismo das metacercárias (Souza et al., 2013). Este trematódeo também foi utilizado como modelo *in vivo* para triagem de fármacos já comercialmente disponíveis, com potencial antihelmíntico, e para esclarecer os mecanismos de ação e as alterações morfológicas decorrentes de seu uso (Ferraz et al., 2012; Gonçalves et al., 2013).

Durante a fase adulta, o *E. paraensei* habita o intestino delgado do hospedeiro definitivo, que elimina ovos imaturos com suas fezes. Ao encontrar condições ambientais apropriadas, como em riachos e corpos de água doce, esse parasito desenvolve um estágio ciliado de miracídio que eclode do ovo e infecta ativamente o hospedeiro intermediário. Sob condições experimentais, pode infectar moluscos do gênero *Biomphalaria* spp., *Physa marmorata* ou *Lymnaea collumela* (Maldonado et al., 2001b; Maldonado e Lanfredi, 2009; Pinheiro et al., 2009). Dentro do gastrópode, os miracídios sofrem reprodução assexuada e produzem os estádios de esporocisto, rédia e cercária. As cercárias liberadas dos moluscos atingem o meio aquático e se encistam em um segundo hospedeiro intermediário (moluscos, anfíbios, peixes ou crustáceos) como metacercárias, que é a forma infectante do hospedeiro definitivo (Esteban e Munoz-Antoli, 2009). O hospedeiro definitivo é infectado pela ingestão do segundo hospedeiro intermediário infectado abrigando metacercárias, que se desencistam no trato gastrointestinal e se fixam à mucosa duodenal com o auxílio de ventosas (Fried e Huffman, 1996).

Neste estudo, utilizamos os estádios de desenvolvimento do trematódeo *E. paraensei* (ovo, miracídio, cercária, metacercária, larvas recém desencistadas, helmintos aos sete e catorze dias após a infecção) como modelo para avaliar a mortalidade e as alterações de comportamento deste helminto causado pela exposição ao Roundup® Original *in vivo* e *in vitro*.



## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 O isolado *Echinostoma paraensei*

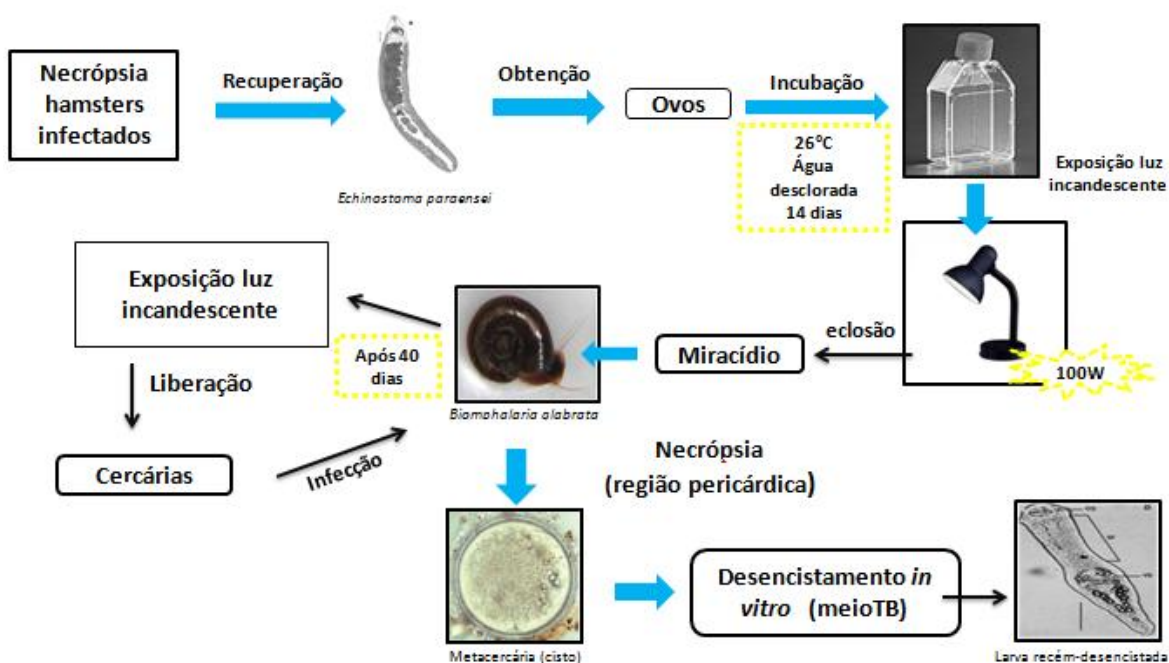
O isolado *E. paraensei* utilizado foi obtido de roedores silvestres, *N. squamipes*, naturalmente infectados, coletados no município de Sumidouro, estado do Rio de Janeiro (22°02'46''S, 42°41'21'' W) (Maldonado et al., 2001a). O ciclo de vida de *E. paraensei* é regularmente mantido no Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios (Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil) através de passagens em *Mesocricetus auratus* (hamsters) e *B. glabrata* como hospedeiros definitivo e intermediário, respectivamente (Garcia et al., 2011) (Figura 1). Todos os experimentos foram realizados de acordo com as regras do Comitê de Ética ao Uso de Animais (CEUA) da Fundação Oswaldo Cruz (Permissão: LW-51/14).

#### 2.1.1 Obtenção dos estádios de miracídio e cercária

Roedores *M. auratus*, na terceira semana de infecção, foram eutanasiados após serem anestesiados com Cetamina (5 mg / kg, peso corporal) e Xilazina (0,5 mg / 100 g, peso corporal), usando uma câmara de CO<sub>2</sub>, e subsequentemente necropsiados, para a recuperação de helmintos adultos do intestino delgado. Os ovos foram recuperados do útero dos helmintos, e incubados em água desclorada a 26 °C durante 14 dias no escuro. Após esse período, os ovos foram exposto à luz sob uma lâmpada incandescente de 100 W para estimular a eclosão de miracídios. Espécimes de *B. glabrata* provenientes do município de Sumidouro, Rio de Janeiro (22°02'46''S, 42°41'21'' W), que são regularmente mantidos no Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, foram infectados individualmente com 10 miracídios e após 26 dias, expostos à luz artificial para induzir a emergência cercariana (Garcia et al., 2011) (Figura 1).

## 2.1.2 Obtenção de larvas recém desencistadas

As larvas foram obtidas através do desencistamento *in vitro*, de acordo com Souza et al. (2013). As metacercárias foram recuperadas por dissecação da região pericárdica de *B. glabrata* infectada experimentalmente por *E. paraensei* com o auxílio de microscópio estereoscópico. As metacercárias foram colocadas em meio alcalino (meio TB) contendo 0,5% de tripsina (1:250, pâncreas de porco, GIBCO) mais 0,5% de sais de bile (Sigma-Aldrich) em solução salina balaceada de Earle (SSB de Earle) (6,8 g/L de NaCl; 0,4 g/L de KCl; 0,2 g/L de CaCl<sub>2</sub>; 0,1 g/L de MgSO<sub>4</sub>; 0,125 g/L de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O; 2,2 g/L de NaHCO<sub>3</sub> e 1 g/L D-glicose) a 37 ° C e 5% de CO<sub>2</sub> (Figura 1).



**Figura 1:** Obtenção dos diferentes estádios de *Echinostoma paraensei* em condições experimentais (Fonte: Maldonado et al. 2001a; Souza et al., 2013).

### **2.1.3 Infecção experimental de roedores e obtenção de helmintos adultos**

Para análise *in vitro*, quatro hamsters fêmeas, com três semanas de idade, foram infectados com metacercárias coletadas de moluscos (*B. glabrata*) experimentalmente infectados por *E. paraensei*, para obter helmintos com sete e catorze dias após a infecção. Cada animal foi infectado por gavagem com 50 metacercárias de *E. paraensei*. Os hamsters receberam alimentos comerciais (Nuvilab) e água *ad libitum* e foram mantidos sob um ciclo luz/escuro de 12 h, a 22 °C e 50% de umidade. Dois animais foram eutanasiados em cada período (sete e catorze dias, respectivamente) após serem anestesiados com Cetamina (5 mg/kg, peso corporal) e Xilazina (0,5 mg/100 g, peso corporal) e posteriormente necropsiados em câmara de CO<sub>2</sub>, para recuperar os helmintos do intestino delgado (Ferraz et al., 2012).

Os efeitos *in vivo* do Roundup® foram avaliados pela carga parasitária recuperada e produção de ovos de *E. paraensei*, utilizando diferentes concentrações do herbicida. Doze hamsters fêmeas, de três semanas de idade, foram infectados por gavagem com 30 metacercárias de *E. paraensei* após exposição ao herbicida (conforme descrito no item 2.2.4). Os animais foram eutanasiados e necropsiados 21 dias após a infecção como descrito acima.

## **2.2 Exposição ao Roundup®**

### **2.2.1 Concentrações utilizadas nos experimentos**

O herbicida Roundup® Original (480 g/L sal de isopropilamina N-(fosfometil) glicina; Ácido equivalente 360 g/L N-(fosfometil) glicina; 684 g/L de ingredientes inertes; Monsanto do Brasil Ltda., N° Lote: RRO01/1307-00), foi submetido a diluições sucessivas a partir da concentração de 1% do equivalente ácido (3600 mg/L - 0 mg/L) em meio de cultivo RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com 100 U/mL de penicilina, 100 mg/L de estreptomicina, 0,25 mg/mL de anfotericina e 20% de soro fetal bovino, para determinar a concentração letal média (CL<sub>50</sub> = 316,8 mg/L) e selecionar as concentrações de teste.

### **2.2.2 Efeitos *in vitro* na eclosão de miracídios de *Echinostoma paraensei***

Os ovos foram recuperados de helmintos com 21 dias de pós infecção. Os efeitos sobre a eclosão de miracídio foram avaliados em três períodos embrionários diferentes: ovos recém-embrionados (dia 0), miracídios em desenvolvimento (dia 7) e miracídios desenvolvidos (dia 10) (Idris e Fried, 1996). Noventa ovos de cada período de desenvolvimento foram expostos por 24 h a três concentrações de Roundup® (225, 450 ou 900 mg/L) obtidos por diluições em série com água desclorada ou água desclorada somente, para o grupo controle. Após este tempo, os ovos foram removidos do Roundup® e lavados três vezes em água desclorada. No 14º dia depois da incubação inicial, a 26 °C no escuro, os ovos foram expostos a lâmpada incandescente (100 W) por quatro horas para estimular a eclosão de miracídios. Os miracídios liberados foram contados sob um microscópio estereoscópico (Zeiss Stemi SV6) (Maldonado et al., 2011b; Raffel et al., 2009). Os ensaios foram realizados em triplicata.

### **2.2.3 Mortalidade e cultivo *in vitro***

Para verificar a mortalidade, foram utilizadas 120 larvas recém desencistadas, 40 helmintos com sete dias e 40 helmintos com catorze dias. As larvas e formas adultas foram lavadas duas vezes na solução de Locke e transferidos para o meio de cultivo RPMI 1640 suplementado contendo uma das três concentrações de Roundup® (225, 450 ou 900 mg/L) a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub> (Panic et al., 2013). O grupo controle foi exposto ao meio de cultivo sem Roundup® nas mesmas condições.

A mortalidade dos espécimes foi aferida após 2, 3, 4, 6, 12 e 24 h. Os espécimes vivos foram avaliados através de estimulação mecânica com a ajuda de uma agulha de insulina 26 G 1/2 (13 x 0,45 mm) assim como pelo método de exclusão com corante vital Azul de Tripán a 0,5% (0,5 g de Azul de Tripán, solução salina 100 mL) sob um microscópio estereoscópico (Zeiss Stemi SV6) (Panic et al., 2013). Os ensaios foram realizados em duplicata.

Trinta miracídios e 30 cercárias foram colocados em uma placa de 24 poços (dez espécimes em cada poço) com diferentes concentrações de

Roundup®, variando de 900 a 3,6 mg/L, obtidas por diluições em série com água desclorada, ou com água desclorada apenas para o grupo controle. A mortalidade dos espécimes foi analisada em diferentes intervalos de tempo (15, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 min) sob um microscópio estereoscópico (Zeiss Stemi SV6) (Raffel et al., 2009). Os ensaios foram realizados em triplicata.

#### **2.2.4 Taxa de desencistamento de metacercárias**

A fim de avaliar os efeitos sobre o desencistamento de metacercárias, estas foram transferidos para solução de Locke contendo 225, 450 ou 900 mg/L de Roundup® ou a solução de Locke apenas para o grupo controle, durante duas horas em temperatura ambiente. Após este período, as metacercárias foram transferidas para o meio TB para realização do desencistamento *in vitro*, como descrito acima (Souza et al., 2013). O processo de desencistamento foi avaliado em 60, 120, 210 e 270 min. Os ensaios foram realizados em duplicata.

A partir do experimento anterior, 90 metacercárias do grupo exposto a 900 mg/L que não desencistaram após 270 minutos, foram removidas do meio TB e lavado na solução de Locke para posterior infecção de três hamsters (30 metacercárias por roedor), para observar se os efeitos do agrotóxico seriam reversíveis *in vivo*. Helmintos adultos foram recuperados de hamsters aos 21 dias após a infecção por dissecação do intestino delgado, conforme descrito no item 2.1.3.

#### **2.2.5 Carga parasitária e produção de ovos**

Trinta metacercárias foram previamente expostas a 225, 450 ou 900 mg/L de Roundup® ou solução de Locke apenas (grupo controle) durante duas horas à temperatura ambiente, antes da infecção dos roedores. Os helmintos adultos foram recuperados de hamsters aos 21 dias após-infecção por dissecação do intestino delgado. O número de helmintos adultos foi avaliado para cada concentração. Ovos uterinos recuperados de seis helmintos selecionados aleatoriamente foram usados para determinar a produção de ovos por indivíduo para cada concentração Roundup®, seguindo Maldonado et al. (2001b).

## 2.3 Análise estatística

A análise de variância (ANOVA *One-way*) foi utilizada para determinar diferenças entre concentrações na carga parasitária e produção de ovos. A análise de variância de duas vias (ANOVA *Two-way*) foi utilizada para identificar diferenças na taxa de desencistamento das metacercárias, de acordo com as concentrações e ao tempo. O teste de Tukey foi realizado *post-hoc* para indicar diferenças significativas. O teste T foi utilizado para investigar a taxa de desencistamento dentro de cada período entre as concentrações. O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para determinar diferenças de mortalidade de miracídios e cercárias, de acordo com as concentrações e intervalo de tempo, uma vez que os dados não eram normalmente distribuídos. Nestes casos, o teste de Mann-Whitney *post hoc* foi aplicado para indicar diferenças significativas, usando concentrações até 56,3 mg/L para miracídios e até 225 mg/L para cercárias. O teste de Fisher foi utilizado para investigar as diferenças de taxa de eclosão de miracídios entre concentrações dentro de cada período embrionário.

Comparações das taxas de mortalidade entre diferentes estádios do desenvolvimento (larva recém desencistada, helmintos aos sete dias e aos catorze dias) e entre as diferentes concentrações Roundup® foram realizadas usando Modelos Lineares Generalizados (GLM), em que o melhor modelo foi escolhido usando os Critérios de Informação Akaike corrigidos para amostras finitas (AICc).

Todos os dados foram testados para distribuição normal usando o Teste de Shapiro-Wilk. As análises foram realizadas usando PAST v3.08 (Hammer et al., 2001), com exceção das análises GLM que foram realizadas usando SPSS versão 21. Valores com  $p \leq 0,05$  foram considerados significativos.

## 3. RESULTADOS

### 3.1 Taxa de eclosão de miracídios

Ao comparar a taxa de eclosão de miracídios entre as concentrações em cada período embrionário, encontramos diferença significativa entre o grupo

controle e as concentrações apenas para os ovos recém-embrionados (dia 0), nos quais observamos uma redução no número de eclosão de miracídios, a partir da menor concentração ( $p = 0,041$ ). Miracídio em desenvolvimento (dia 7) ( $p = 0,983$ ); miracídio desenvolvido (dia 10) ( $p = 0,535$ ) (Tabela 1).

**Tabela 1:** Taxa de eclosão de miracídios (%) de *Echinostoma paraensei in vitro* (n=90) após 24h de exposição a diferentes concentrações de Roundup em diferentes períodos embrionários.

GRUPO	ECLOSÃO DE MIRACÍDIOS (%)				
	ROUNUP® (mg/L)	CONTROLE	225	450	900
<b>PERÍODO EMBRIONÁRIO</b>					
Ovos recém-embrionados		13,3	4,4	3,3	1,1
Miracídio em desenvolvimento		7,7	10	6,6	8,8
Miracídio completamente desenvolvido		13,3	7,7	12,2	5,6

### 3.2 Mortalidade *in vitro*

Houve uma diferença significativa na mortalidade de miracídios entre as concentrações até 56,3 mg/L. Foi observado 100% de mortalidade a partir de 112,5 mg/L (miracídio:  $H_c = 25,84$ ;  $p = 9,596E-05$ ). O mesmo efeito foi observado para cercárias (cercária:  $H_c = 43,05$ ;  $p = 3,257E-07$ ), e a mortalidade foi observada a partir de 15 minutos de exposição as concentrações de 225 a 900 mg/L. Nas concentrações variando de 28,2 a 112,5 mg/L, a mortalidade foi detectada após 30 minutos (Tabelas 2 e 3). O estágio de miracídio mostrou maior sensibilidade do que as cercárias ao herbicida.

As taxas de mortalidade de miracídios e cercárias em diferentes concentrações não mostraram diferença significativa de acordo com tempo de exposição (miracídio:  $H_c = 10,5$ ;  $p = 0,105$ ) (cercária:  $H_c = 5,892$ ;  $p = 0,435$ ). No entanto, diferenças significativas nas taxas de mortalidade, quando realizada a comparação por pares, foram observadas entre 15 minutos de exposição e 120, 150 e 180 min, para miracídios ( $U = 5$ ,  $p = 0,0416$ ;  $U = 4$ ,  $p = 0,027$ ;  $U = 4$ ,  $p =$

0,027, respectivamente). Em 180 minutos, os miracídios que permaneceram vivos mostraram movimentos lentos. A maioria dos espécimes de cercárias perdeu a cauda quando exposto a concentrações mais elevadas do herbicida. Em concentrações mais baixas, as cercárias aparentemente apresentaram movimentos similares ao grupo controle.

**Tabela 2:** Mortalidade (%) de miracídios de *Echinostoma paraensei in vitro* (n = 30) após 180 minutos de exposição a diferentes concentrações de Roundup®.

GRUPO		MIRACÍDIO				
ROUNDUP® (mg/L)	CONTROLE	3,6	7,1	14,1	28,2	56,3
<b>TEMPO EXPOSIÇÃO (MIN)</b>						
15	0	0	10	0	0	70
30	0	0	10	10	66,7	100
60	0	13,8	32,2	18,5	83,3	100
90	0	25,4	43,2	32,7	91,7	100
120	3,6	39,2	52,8	68,8	95	100
150	3,6	47,1	57,8	81,9	100	100
180	3,6	50,9	66	100	100	100



**Tabela 3:** Mortalidade *in vitro* (%) de cercárias de *Echinostoma paraensei* (n = 30) após 180 minutos de exposição a diferentes concentrações de Roundup®.

GRUPO		CERCÁRIA									
ROUNDUP® (mg/L)	CONT	3,6	7,1	14,1	28,2	56,3	112,5	225	450	900	
<b>TEMPO EXPOSIÇÃO (MIN)</b>											
15	0	0	0	0	0	0	0	74,8	86,7	100	
30	0	0	0	0	1,8	50	26,8	95	100	100	
60	0	0	0	1,7	31,7	50	72,3	100	100	100	
90	0	0	0	1,7	39,3	65	96,5	100	100	100	
120	0	0	0	1,7	48,2	65	100	100	100	100	
150	0	0	0	1,7	50	70	100	100	100	100	
180	0	0	0	1,7	63,4	80	100	100	100	100	

Quanto aos efeitos da concentração do herbicida em larvas recém desencistadas, e em helmintos com sete e catorze dias, os resultados mostraram uma diferença significativa em 24 h após a exposição para todos os estádios (NEL: Hc = 20,63, p = 0,0001) (sete dias: Hc = 21,79, p = 7,203E-05) (catorze dias: Hc = 14,68, p = 0,0021). No entanto, ao comparar as taxas de mortalidade ao longo do tempo para os três estádios de desenvolvimento, não foi encontrado diferença significativa (NEL: Hc = 1.1, p = 0.954) (sete dias: Hc = 98,1, p = 0,998) (catorze dias: Hc = 4,49, p = 0,480) (Tabela 4).

O melhor modelo obtido no teste GLM indicou que as taxas de mortalidade das larvas recém desencistadas e dos dos helmintos de sete dias e catorze dias foram dependentes da concentração (Tabela 5).

**Tabela 4:** Mortalidade *in vitro* (%) de larvas recém desencistadas (n=120) de *Echinostoma paraensei* e helmintos recuperados após sete (n=40) e catorze dias (n=40) de infecção em *Mesocricetus auratus* (hamsters) após exposição a diferentes concentrações de Roundup® em diferentes intervalos de tempo.

FASES DE DESENVOLVIMENTO												
GRUPOS	LARVAS				7 DIAS				14 DIAS			
ROUNDUP® (mg/L)	C	225	450	900	C	225	450	900	C	225	450	900
<b>TEMPO EXPOSIÇÃO (HORAS)</b>												
2	0	0	50	70,8	0	0	50	70	0	0	0	0
3	0	0	50,8	100	0	0	50	100	0	0	32,5	50
4	0	0	50,8	100	0	0	58,4	100	0	0	50	50
6	0	0	54,1	100	0	0	58,4	100	0	0	50	50
12	0	0	100	100	0	0	60,4	100	0	0	50	50
24	0	12,5	100	100	0	14	66,7	100	0	20	50	60

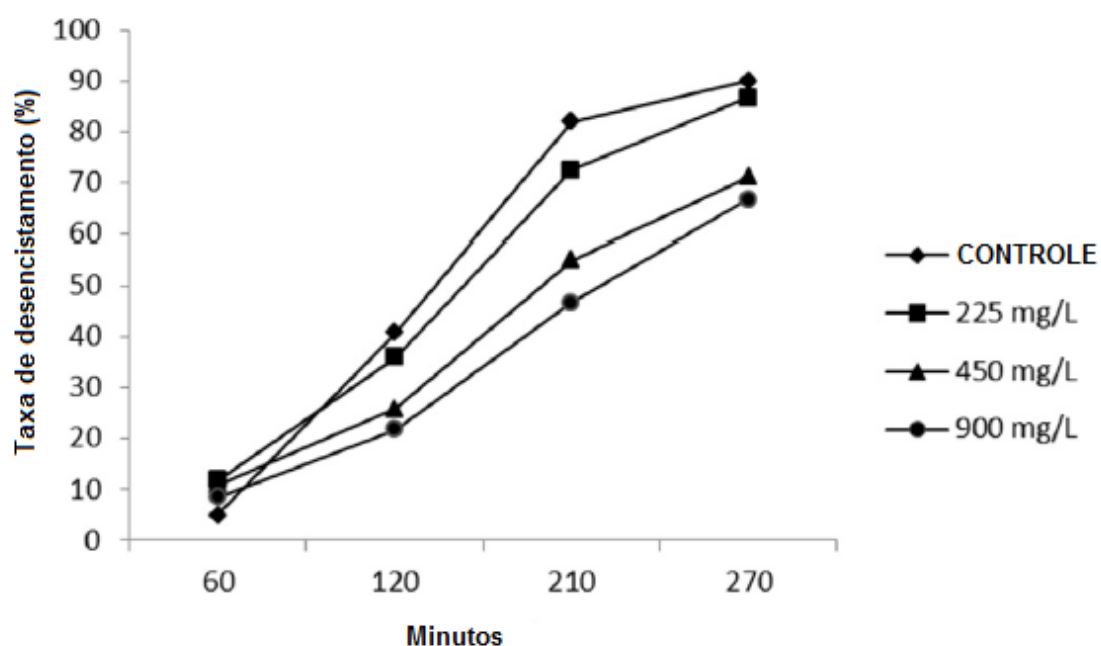
**Tabela 5:** Modelos testados para comparações das taxas de mortalidade entre diferentes estádios de desenvolvimento de *Echinostoma paraensei* (larva recém desencistada, helmintos com sete e catorze dias) e entre diferentes concentrações de Roundup® usando modelos lineares generalizados (GLM). O melhor modelo foi escolhido usando os Critérios de Informação Akaike.

MODELO	AICc	$\Delta$ AICc	w AICc
Concentração	114,384	0	1
Concentração + Estádio de desenvolvimento	122,869	8,485	0
Nulo	127,469	13,085	0
Estádio de desenvolvimento	135,274	20,89	0

### 3.3 Taxa de desencistamento de metacercárias de *Echinostoma paraensei*

A taxa de desencistamento de metacercárias foi influenciada pela concentração do herbicida, mostrando diferença significativa entre os grupos ( $F = 5,74$ ;  $p = 0,01$ ;  $df = 3$ ), bem como entre os períodos de tempo para o desencistamento ( $F = 72,4$ ;  $p = 1,272E-06$ ;  $df = 3$ ). O teste de Tukey mostrou diferenças significativas na taxa de desencistamento ao final do período testado entre o grupo controle e o grupo exposto a 900 mg/L ( $P = 0,02$ ), e entre o grupo de 225 mg/L e o grupo de 900 mg/L ( $p = 0,05$ ). Diferenças significativas foram observadas entre todos os períodos de desencistamento dentro de cada grupo ( $p < 0,05$ ), exceto entre 210 e 270 min (Figura 2). A taxa de desencistamento dentro de cada período não mostrou diferenças significativas entre as concentrações em qualquer caso ( $p = 1$ ).

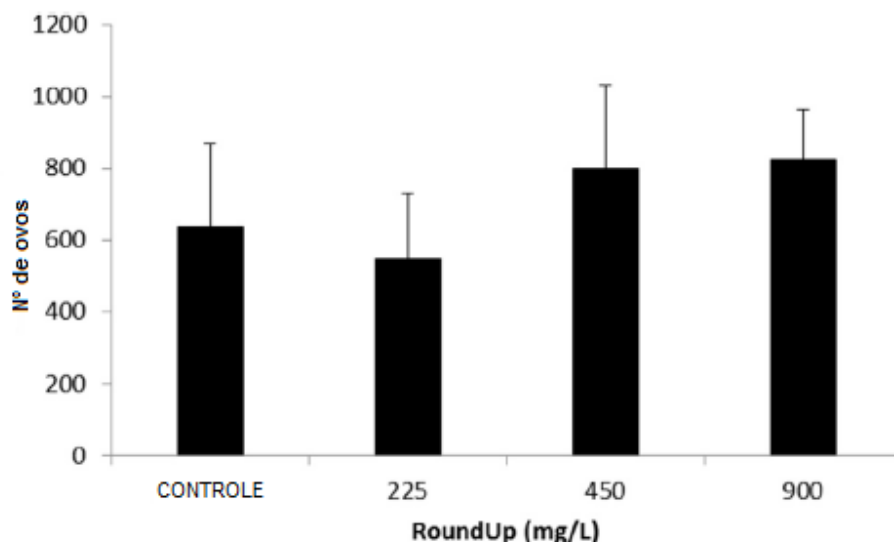
As metacercárias encistadas mostraram estágio ativado fraco, com movimentos lentos em todas as concentrações do herbicida, levando a um atraso no processo de desencistamento, conforme descrito por Souza et al. (2013) que define quatro estágios para o processo de desencistamento. Foi observada uma redução de 97% na carga parasitária recuperada de roedores infectados com metacercárias previamente expostas a 900 mg/L, que não desencistaram *in vitro*.



**Figura 2:** Taxa de desencistamento (%) de metacercárias de *Echinostoma paraensei in vitro* (n = 60) anteriormente expostas a diferentes concentrações de Roundup® (mg/L), ao longo do tempo.

### 3.4 Carga parasitária e produção de ovos *in vivo*

As médias  $\pm$  DP (desvios padrão) das cargas parasitárias recuperadas de roedores infectados foram: grupo controle =  $16,7 \pm 4,5$ ; grupo exposto a 225 mg/L =  $14,7 \pm 4,5$ ; grupo exposto a 450 mg/L =  $15,5 \pm 2,1$  e grupo exposto a 900 mg/L =  $15,7 \pm 3,5$ . Não houve diferença significativa entre as cargas parasitárias nas concentrações utilizadas ( $F = 0,690$ ;  $p = 0,583$ ;  $df = 3$ ), assim como no número de ovos produzidos pelos helmintos ( $F = 2,78$ ;  $p = 0,067$ ;  $df = 3$ ) (Figura 3).



**Figura 3:** Número médio e desvios padrão de ovos de *Echinostoma paraensei* recuperados 21 dias após a infecção de *Mesocricetus auratus* com 30 metacercárias previamente expostas por duas horas a diferentes concentrações de Roundup®.

#### 4. DISCUSSÃO

No presente estudo, diferentes estádios de desenvolvimento do ciclo de vida do trematódeo *E. paraensei* foram expostos ao herbicida Roundup® *in vitro* e *in vivo* para avaliar os efeitos na mortalidade do helminto e seu comportamento. Mortalidade dependente da concentração foi observada nos diferentes estádios de desenvolvimento do parasito. Vários estudos foram realizados com agrotóxicos, incluindo glifosato e Roundup®, para verificar os efeitos em organismos não alvo, como os peixes (Gluszczak et al., 2007; Langiano & Martinez, 2008), moluscos (Hock & Poulin, 2012; Bakry et al., 2015), anfíbios (Dornelles & Oliveira, 2014) e mamíferos (El-Shenawy, 2009).

Os ovos de *E. paraensei* são ovais, operculados e liberados embrionados nas fezes do hospedeiro definitivo no meio ambiente. Estes ovos recém

embrionados têm apenas glóbulos vitelínicos e o embrião, os quais não são desenvolvidos até alcançar condições ambientais adequadas (Idris & Fried, 1996). Estes ovos podem ser expostos a poluentes ambientais, tais como produtos de degradação de agrotóxicos, que podem afetar o desenvolvimento do estágio larval de miracídio. No presente estudo, foi observado os efeitos de 24 h de exposição ao herbicida Roundup® na eclosão de miracídios apenas nos ovos recém-embrionados. Isso evidenciou que o herbicida possa interferir com o desenvolvimento embrionário adequado de miracídios, reduzindo sua taxa de eclosão em condições naturais. Estes resultados diferem dos realizados por Raffel et al. (2009), que usaram apenas o ingrediente ativo, glifosato, nos ovos e miracídios de *Echinostoma trivolvis*. Maldonado et al. (2001b) mostraram movimentos de miracídios de *E. paraensei* com 6 dias de desenvolvimento, sugerindo que os ovos entre 7 e 10 dias quando expostos a diferentes concentrações de Roundup® não seriam tão afetados, já que eles já estariam em um estágio mais avançado de desenvolvimento.

Os efeitos adversos diretos sobre os estádios de vida livre de trematódeos não foram investigados minuciosamente, apresentando resultados inconclusivos sobre a sensibilidade de miracídios e cercárias a contaminantes ambientais. Raffel et al. (2009) não mostraram evidências de efeitos biológicos significativos (sucesso de eclosão e sobrevivência de miracídios) do glifosato em concentrações ecologicamente relevantes sobre embriões e miracídios de *E. trivolvis*. Em um estudo anterior, Rohr et al. (2008) expuseram cercárias de *E. trivolvis* a diferentes agrotóxicos, incluindo glifosato, e mostraram que esses levavam a uma mortalidade significativamente maior em cercárias expostas do que o grupo controle, mas apenas o herbicida atrazina reduziu significativamente a sobrevivência cercariana. Apesar de em ambos os estudos o tempo de exposição ter sido de 24 h, os autores apenas utilizaram o ingrediente ativo em baixas concentrações. No presente estudo o herbicida testado, Roundup®, possui outros componentes além do glifosato, os quais podem contribuir para os efeitos observados.

Em contraste, nossos dados mostraram que miracídios apresentaram maior porcentagem de mortalidade para Roundup® do que cercárias, usando as

mesmas concentrações. Isso pode ser devido a ingredientes inertes presentes em formulações comerciais, como o surfactante POEA, que atua como disruptor das membranas celulares e amplia a toxicidade induzida pelo ingrediente ativo, como demonstrado em cultura celular (Marc et al., 2002; Benachour & Sèralini, 2009). Além disso, as cercárias estão cobertas por glicocálix que recobre sobre o tegumento que é constituído por um sistema de membrana trilaminada que pode atuar como barreira física para o Roundup® (Dorsey et al., 2002) enquanto miracídeos possuem placas epidérmicas com espaços interepidérmicos, o que pode facilitar a penetração do herbicida (Pinheiro et al., 2004) e, portanto, ser mais sensível. O estágio de cercária dos trematódeos depende de um estoque de glicogênio para o metabolismo energético. Morley et al. (2003) sugeriram que a inibição de enzimas relacionadas ao metabolismo está envolvido em alterações na sobrevivência cercariana quando expostas a contaminantes. Alguns autores sugeriram que a toxicidade dos agrotóxicos, na sobrevivência dos miracídeos de *Fasciola hepatica*, está associado à inibição da função enzimática, o que poderia influenciar na respiração e utilização de glicogênio, alterando a vida útil (Bonieka & Guttowa, 1975; Moczon, 1976a, b).

A cauda cercariana desempenha um papel crucial na vida das cercárias devido sua função locomotora, e tem sido sugerido que a perda da cauda é um indicador de mortalidade, e tem por objetivo reduzir a demanda de energia (Morley et al., 2002, 2005). No presente estudo, a perda da cauda da cercária pode ser considerada uma primeira etapa de mortalidade induzida pelo Roundup®, sugerindo que o herbicida influencia o metabolismo energético desse estágio larval, podendo afetar o sucesso de penetração cercariana. Além disso, a diminuição da competência de natação cercariana observada, e depois a morte, também pode ser explicada pela presença de receptores sensoriais e neurônios no corpo das cercárias que podem ter sido afetados pelo Roundup®, consequentemente afetando seu sistema neuromuscular (Sebelová et al., 2004; Tolstakov et al., 2012).

A metacercária é caracterizada por ter uma parede protetora constituída de multicamadas. A alta tolerância a substâncias tóxicas no meio ambiente pelas metacercárias é esperado, mesmo com exposição direta, uma vez que são

protegidas pela parede cística. Alguns estudos sugeriram que as metacercárias não estão diretamente expostas ao toxicante dentro do hospedeiro, mas apenas aos contaminantes que se acumulam em tecidos adjacentes (Siddall, 1992; Morley et al., 2003; Chlopecka et al., 2014). Estudos anteriores *in vitro* relacionados ao processo de encistamento de *Echinostoma revolutum* mostraram que o mesmo ocorreu no muco do molusco, com os cistos apresentando características normais (Fried & Bennett, 1979) e também para *E. paraensei*, o encistamento ocorreu na presença de células embrionárias de moluscos em cultura (Stein & Basch, 1977). Estes achados destacam a importância de analisar o efeito da Roundup® em metacercárias, que embora geralmente se encistem dentro do hospedeiro, pode ocorrer o encistamento ectópico.

Além disso, estudos com metacercárias de *Fasciola gigantica* Cobbold, 1855 mostraram inibição da infectividade ao hospedeiro definitivo quando expostas cronicamente aos resíduos de silagem (Gupta & Kamra, 1987). A exposição a substâncias tóxicas, como fertilizantes, também causou uma redução no estabelecimento de *F. hepatica*, provavelmente devido ao aumento da mortalidade das metacercárias (Brglez & Wikehauser, 1968). Em contraste, em um estudo sobre a influência da toxicidade de metais, como cobre e zinco, na infectividade de metacercárias de *Notocotylus attenuatus* cronicamente expostas, Evans (1982) não encontrou redução significativa na carga parasitária recuperada de pintos a partir da infecção com as metacercárias expostas a esses metais ou com as que não foram expostas (controle). No presente estudo, além de ter sido investigado os efeitos de um herbicida, foi realizada exposição aguda das metacercárias a diferentes concentrações de Roundup® Original, o que poderia explicar a carga parasitária similar recuperada do hospedeiro definitivo.

Morley et al. (2001) realizaram estudos de desencistamento *in vitro* com metacercárias de *Parorchis acanthus* Nicoll, 1907 para avaliar mudanças na taxa de desencistamento após exposição a metais pesados tóxicos. Os autores notaram uma flutuação na taxa de desencistamento, o que foi atribuído a uma alteração na integridade estrutural das camadas nos cistos expostos. Posteriormente, Bennett et al. (2003) mostraram redução significativa no desencistamento *in vitro* com concentrações elevadas de agrotóxicos ao avaliar



os efeitos do tributilestano e de metais pesados em metacercárias do mesmo trematódeo. A porcentagem de metacercárias desencistadas diminuiu com o aumento da concentração de agrotóxicos. Esses achados corroboram nossos resultados, que mostram uma diminuição na taxa de desencistamento com o aumento das concentrações do herbicida. Isso sugere a penetração do Roundup® através do cisto pelas camadas da parede cística, interferindo com o metabolismo e influenciando no processo de desencistamento, tanto *in vitro* e *in vivo*.

Poucos estudos com agrotóxicos foram realizados com estádios adultos de helmintos, que tem sido focados em estádios de vida livre de trematódeos (Raffel et al., 2009; Rohr et al., 2008). Avaliamos a mortalidade *in vitro* de larvas recém desencistadas, bem como helmintos jovens e adultos, que apresentaram mortalidade dependente da concentração. O ingrediente ativo, glifosato, é menos tóxico do que o surfactante POEA, que é considerado um ingrediente inerte presente nas formulações comerciais, demonstrando a toxicidade em diferentes organismos (Adam et al., 1997; Tsui & Chu, 2003). Em estudos de toxicidade em cultura de células humanas de linhagens hepáticas (HepG2), embrionárias (HEK293) e placentárias (JEG3), usando POEA, Mesnage et al. (2013) observaram efeitos negativos na respiração celular e sobre a integridade da membrana que estavam relacionados aos mecanismos de necrose ligada aos adjuvantes, ao invés do glifosato, em maiores níveis. Anteriormente, Benachour & Sèralini (2009) mostraram danos em células humanas, como células umbilicais neonatais (HUVEC), células embrionárias de rim e células placentárias (JEG3), causado pelo glifosato e suas formulações comerciais, tais como disrupção celular e danos às membranas mitocondriais, promovendo a necrose e causando morte celular total, indicando que o surfactante POEA em formulações de Roundup® não é inerte. Esses resultados à nível celular em metazoários pode sugerir possíveis danos celulares em helmintos, levando a sua morte.

## 5. CONCLUSÃO

Uma vez que os organismos no ambiente estão expostos a agrotóxicos comerciais, a análise desses produtos é necessária para elucidar seus efeitos tóxicos. No presente trabalho, foi observado que todos os estádios de desenvolvimento do trematódeo *E. paraensei* foram afetados pela exposição ao Roundup® em condições experimentais, sugerindo que a dinâmica de transmissão de trematódeos poderia ser alterada em ambiente natural o que reforça a utilidade deste helminto como um bom organismo modelo para testar agrotóxicos em relação à saúde humana e ambiental. A presença de adjuvantes podem aumentar a toxicidade para o parasito, embora mais estudos com o ingrediente ativo (glifosato) e o surfactante (POEA) separadamente são necessários para corroborar esta hipótese.

## **CAPÍTULO III**

### **EFEITOS MORFOLÓGICOS EM HELMINTO PARASITO CAUSADO POR HERBICIDA EM CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS**

Monte TCC, Braga BV, Vasconcellos MC, Jurberg AD, Mota EM, Barbosa HS, Garcia J, Maldonado A. Morphological effects on helminth parasite caused by herbicide under experimental conditions. *Rev Bras Parasitol Vet* 2018; 27(1):41-50. (Anexo III).

## 1. INTRODUÇÃO

Os helmintos parasitos têm sido estudados como potenciais acumuladores de diferentes poluentes resultantes de processos industriais modernos, particularmente helmintos gastrointestinais, à medida que adquirem nutrientes dos conteúdos do lúmen intestinal dos seus hospedeiros vertebrados (Brázová et al., 2015; Mcgrew et al., 2015; Tellez & Merchant, 2015; Sures et al., 2017). Os agrotóxicos afetam o meio ambiente e a biodiversidade e estão relacionados a patologias humanas ligadas à atividade ocupacional e ao consumo de produtos agrícolas expostos (Aktar et al., 2009).

Recentemente, foi demonstrado que a exposição ao herbicida, Roundup®, pode afetar os estádios larvais dependentes do ecossistema aquático do trematódeo, *Echinostoma paraensei*, Lie & Basch, 1967, causando mortalidade de miracídios e cercárias e reduzindo o desenvolvimento de ovos em concentrações abaixo das recomendadas para uso agrícola (Monte et al., 2016). *E. paraensei* é um trematódeo veiculado por alimentos cujo hospedeiro vertebrado é o roedor semi-aquático, *Nectomys squamipes* Brants, 1827 (Lie & Basch, 1967; Maldonado et al., 2001a; Bonvicino et al., 2008). Como são semi-aquáticos, esses roedores são naturalmente expostos a agrotóxicos e seus produtos de degradação no meio ambiente (Ernest & Mares, 1986; Bonvicino et al., 2008). No entanto, pouco se sabe sobre os efeitos do agrotóxico em helmintos parasitos (Monte & Maldonado, 2017).

Portanto, este estudo investigou os efeitos morfológicos nas larvas recém-desencistadas e nas fases jovem e adulto de *E. paraensei* após a exposição a herbicida.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Parasitos e infecção experimental

O isolado de *E. paraensei* foi obtido dos roedores silvestres, *N. squamipes* (Maldonado et al., 2001a). O ciclo de vida de *E. paraensei* foi mantido no Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios do

Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil através de passagens em *Mesocricetus auratus* Waterhouse, 1839 (hamsters) e *Biomphalaria glabrata* (Mollusca) Say, 1818 (Garcia et al., 2011). Todos os experimentos com animais foram conduzidos de acordo com as regras do Comitê Ético ao Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (Licença LW-51/14). Para obter larvas recém-desencistadas, as metacercárias foram recuperados por dissecação em microscópio estereoscópico da região pericárdica de moluscos *B. glabrata* infectados experimentalmente com *E. paraensei*. As metacercárias foram colocadas em meio alcalino com sais biliares e tripsina (meio TB) contendo 0,5% de tripsina (1:250, pâncreas de porco, GIBCO) e 0,5% de sais biliares (Sigma-Aldrich) com a solução salina balanceada de Earle (SSB de Earle), para o desencistamento experimental (Souza et al., 2013).

Quatro hamsters fêmeas, com três semanas de idade, foram infectados experimentalmente. Cada animal recebeu 50 metacercárias de *E. paraensei* obtida como descrito acima, por gavagem, para obter helmintos aos sete e catorze dias após a infecção. Os hamsters receberam alimentos comerciais em grânulos (Nuvilab) e água *ad libitum*, e foram mantidos sob um ciclo luz/escuro de 12 h, a 22 °C e 50% de umidade. Dois animais foram eutanasiados em cada período (7 e 14 dias), após serem anestesiados com cetamina (5 mg / kg, peso corporal) e xilazina (0,5 mg/100 g, peso corporal), usando uma câmara de CO<sub>2</sub> e subsequentemente necropsiados, para recuperar os helmintos do intestino delgado (Ferraz et al., 2012).

## **2.2 Concentrações de Roundup® e exposição *in vitro***

O agrotóxico, Roundup® Original (480 g/L sal de isopropilamina N-(fosfometil) glicina, 360 g/L de ácido equivalente N-(fosfometil) glicina; ingredientes inertes de 684 g/L; Monsanto do Brasil Ltda.; N° Lote: RRO01/1307-00) foi comprado de uma fonte comercial. As diluições sucessivas foram obtidas utilizando meio de cultura RPMI 1640 (Sigma Aldrich), suplementado com 100 U/mL de penicilina, 100 mg/L de estreptomicina, 0,25 mg/mL de anfotericina e 20% de soro fetal bovino, para obter as concentrações

experimentais. Um total de 60 larvas recém desencistadas, 20 helmintos de 7 dias e 20 helmintos de 14 dias foram lavados duas vezes na solução de Locke e transferidos para o meio de cultura RPMI 1640 suplementado contendo as seguintes concentrações de Roundup®: 225 mg/L, 450 mg/L ou 900 mg/L (grupo exposto), ou ao meio de cultura apenas (grupo controle), durante duas horas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> (Panic et al., 2013 modificado). Estas concentrações estão em conformidade com as recomendadas pelo fabricante para uso em campos agrícolas (1-2%) (Monte et al., 2016). Os ensaios foram realizados em duplicata.

Para análise histológica, os helmintos de 14 dias foram expostos apenas à maior concentração de Roundup® (900 mg/L) por 2 horas.

### **2.3 Análises morfológicas**

Para microscopia eletrônica de varredura (MEV), os espécimes (larvas, helmintos de 7 dias e 14 dias) foram removidos do meio de cultura após 2 horas de exposição, transferidos para placas de Petri com solução de Locke e lavados suavemente. Depois disso, as amostras foram fixadas durante 1 h em 2,5% de glutaraldeído diluído em tampão de cacodilato de sódio 0,1 M contendo 3,5% de sacarose a 4 °C, lavado no mesmo tampão a pH 7,2 e pós-fixado durante 2 horas a 4 °C numa solução de OsO<sub>4</sub> a 1% em tampão de cacodilato de sódio 0,1 M. Os espécimes foram então desidratados através de uma série de etanol crescente (30-100%), durante 1 h em cada etapa, com três passagens em etanol absoluto e secas usando o método do ponto crítico com CO<sub>2</sub> (Gonçalves et al., 2013). O material foi montado em *stubs* de alumínio, revestido com uma camada de ouro de aproximadamente 20 nm e analisado usando um microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM 6390LV, na plataforma de microscopia eletrônica Rudolf Barth do IOC / Fiocruz.

Para a análise histopatológica, os helmintos de 14 dias foram expostos durante 2 h a 900 mg/L de Roundup®. Os helmintos foram suavemente lavados com a solução de Locke e fixados em formol Millonig de Carson por 24 h. Em seguida, o material foi desidratado em concentrações crescentes de etanol,

clarificado com xileno e incluído em parafina líquida a 60 °C (Tolosa et al., 2003). Os blocos foram orientados para obtenção de cortes transversais da estrutura do corpo do helminto. Posteriormente, secções em série de 5 µm de espessura foram cortadas usando um microtomo Leica RM2125. As secções foram coradas com reagentes de hematoxilina e eosina (HE), reticulina de Gomori, para avaliar o depósito de fibras reticulares, e ácido periódico de Schiff (PAS), a fim de avaliar o conteúdo glicídico (Caputo et al., 2010). Secções histológicas de seis helmintos foram medidas para avaliar os danos causados pelo herbicida. As medidas do ceco, a distância entre a borda interna e o lúmen do ceco (hipotrofia celular) (4 medidas realizadas em cada ceco) e o número de células epiteliais do ceco foram inferidas a partir do número de núcleos observados. A espessura do tegumento, da membrana externa à lâmina basal e o número de ácinos de glândulas vitelínicas também foram medidos. As secções foram visualizadas através de um microscópio óptico Zeiss Axio Scope.A1 e as imagens foram capturadas por uma câmera Zeiss Axio Cam MRc. As medições foram processadas usando o software Axio Zen 2 lite.

Para microscopia a laser de varredura confocal (MLVC), os helmintos de 14 dias foram expostos durante 2 h a 900 mg/L de Roundup®. Os espécimes foram corados com carmim clorídrico, desidratados através de uma série de etanol crescente, diafanizados com salicilato de metila e montados no bálsamo do Canadá (Souza et al., 2011). O material foi então analisado usando um microscópio confocal Leica TCS SP8 e um laser de argônio de 488 nm.

## **2.4 Análise estatística**

O teste t foi utilizado para comparar as diferenças das médias entre as medidas realizadas no ceco, a espessura do tegumento para a lâmina basal e os ácinos das glândulas vitelínicas para o controle e grupos experimentais. Todos os dados foram testados para distribuição normal usando o teste de Kolmogorov-Smirnov. Os valores com  $p \leq 0,05$  foram considerados significativos (InStat, GraphPad, v.4.00, Prism, GraphPad, v.3.02, Prism, Inc.).

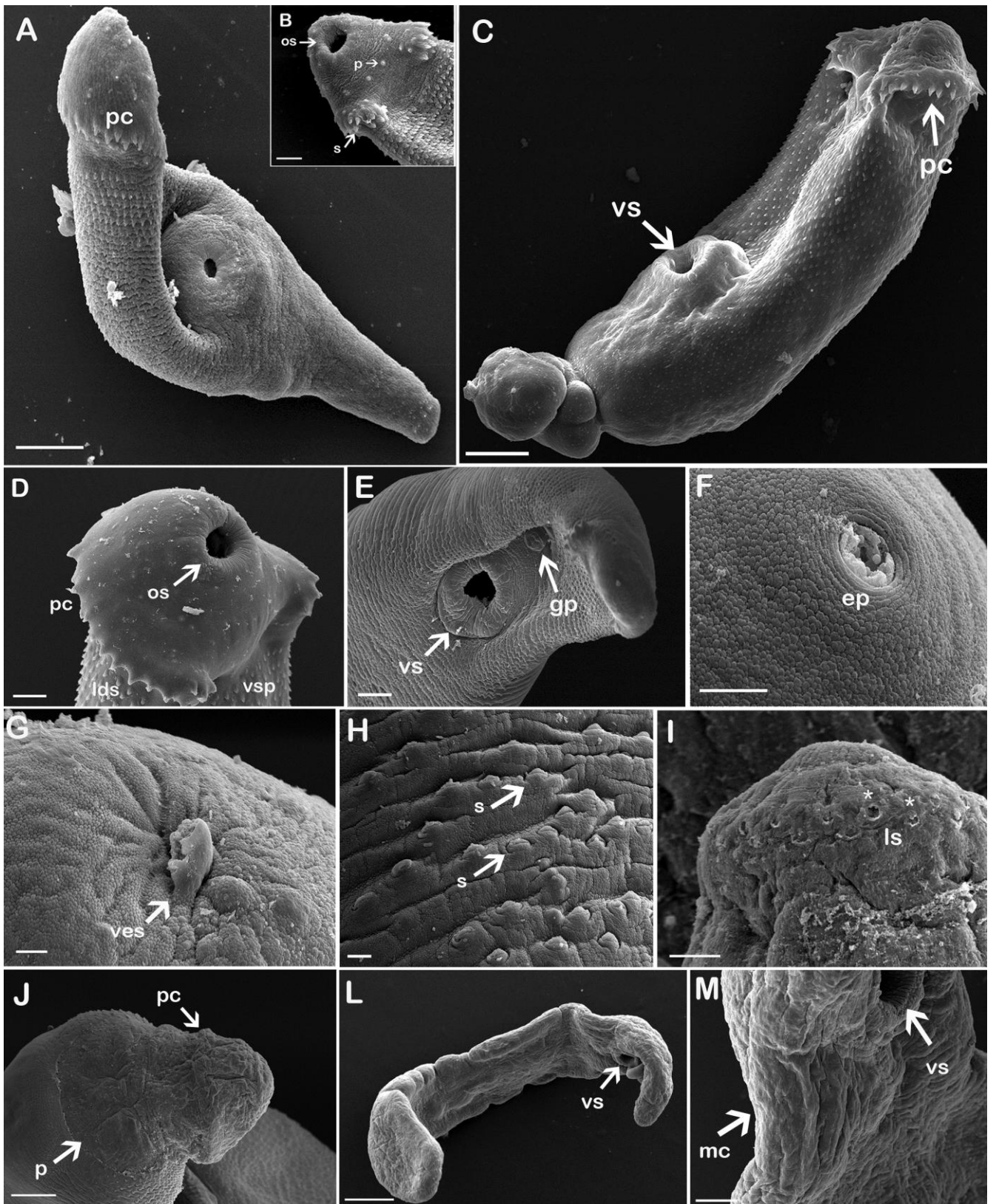
### **3. RESULTADOS**

#### **3.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

As larvas recém desencistadas apresentaram ventosas orais e ventrais preservadas com presença de papilas, bem como o colar peristômico, com espinhos laterais ligeiramente mais longos e espinhos de canto (Figuras 1A-B). No grupo exposto a 225 mg/L de Roundup®, observou-se uma intensa contração da musculatura da extremidade posterior, formando um nó (Figura 1C). As ventosas orais e ventrais dos helmintos de 7 e 14 dias apresentaram-se preservadas, assim como o poro excretor (Figuras 1D-F). Nos helmintos de 14 dias, a presença de vesículas dispersas foi evidente em algumas áreas do corpo, incluindo no poro excretor (Figura 1G), e também foi observado o inchaço do tegumento recobrimdo os espinhos tegumentares (Figura 1H). No grupo exposto a 450 mg/L, os helmintos de 7 dias observou-se a perda dos espinhos do colar peristômico (Figura 1I) enquanto nos helmintos de 14 dias constatou-se a descamação da superfície dorsal (Figura 1J). O grupo exposto a 900 mg/L também apresentou inchaço e enrugamento ao longo do corpo com perda de espinhos no colar peristômico (Figura 1L) e contração muscular na região pós-acetabular (Figura 1M).



**Figura 1:** Micrografia eletrônica de varredura de *Echinostoma paraensei*. **A-B** Grupo controle: Larvas - Colar peristômico preservado (pc) (A). Barra: 20 µm. Detalhe da ventosa oral preservada (os) rodeada pelo colar peristômico com espinho (s) e presença de papilas (p) (B). Barra: 10 µm. **C** Grupo exposto por duas horas a 225 mg/ L de Roundup®: Larvas - Enrugamento da superfície do tegumento, incluindo o ventosa ventral (vs) e a região do colar peristômico (pc), e um nó terminal posterior devido à intensa contração da musculatura. Barra: 20 µm. **D-F** Grupo controle: helmintos de 7 dias - colar peristômico (pc) e ventosa oral (os) com morfologia preservada. Espinhos latero-dorsais preservados (lds) e espinhos ventrais (vsp) (D). Barra: 20 µm. Helmintos de 14 dias anterior - ventosa ventral preservada (vs) e poro genital proeminente (gp) (E). Bar: 100 µm. Helmintos de quatorze anos - Poro excretor (ep) com aspecto preservado (F). Barra: 10 µm. **G-H** Grupo exposto por duas horas a 225 mg/L de Roundup®: helmintos de 14 dias - Tegumento do poro excretor com vesículas (ves) (G). Barra: 10 µm. Tegumento inchado com espinho (s) submerso (s) pelo tegumento ao redor (H). Barra: 10 µm. **I-M** Grupo exposto por duas horas a 450 mg/L e 900 mg/L de Roundup®, respectivamente: helmintos de 7 dias - região do colar peristômico com perda de espinhos (\* ls) (I). Barra: 20 µm. Helmintos de 14 dias - descamação da região dorsal do corpo (p) e enrugamento do colar peristômico sem espinhos (pc) (J). Bar: 100 µm. Corpo com tegumento inchado e enrugado. Ventosa ventral (vs) (L). Barra: 500 µm. Contração muscular (mc) na região pós acetabular (vs) (M). Bar: 100 µm.

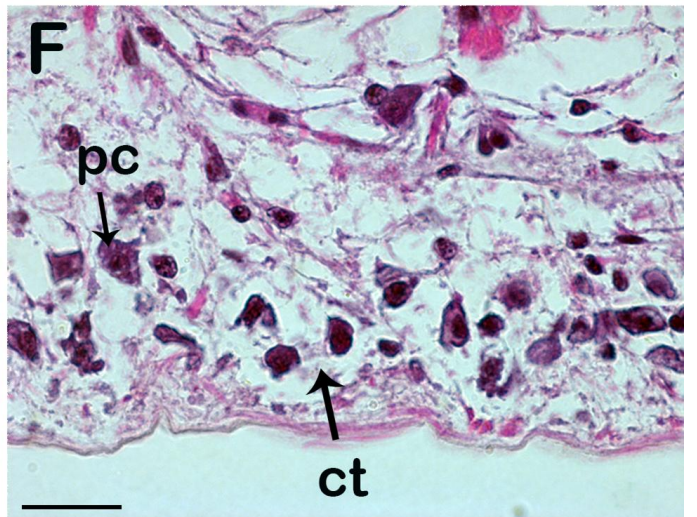
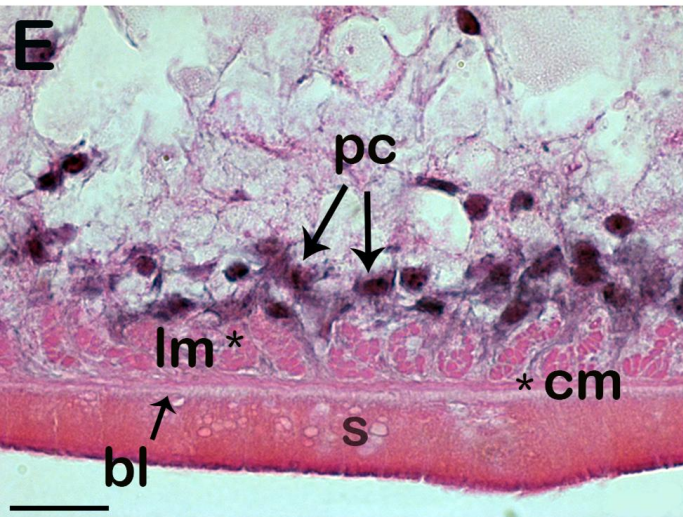
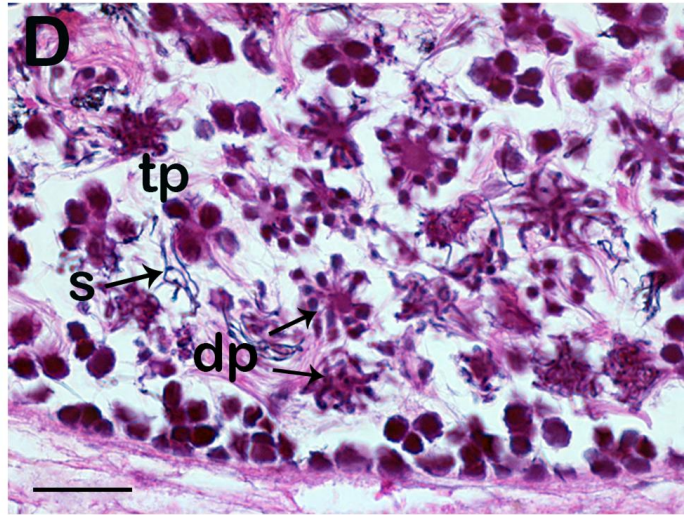
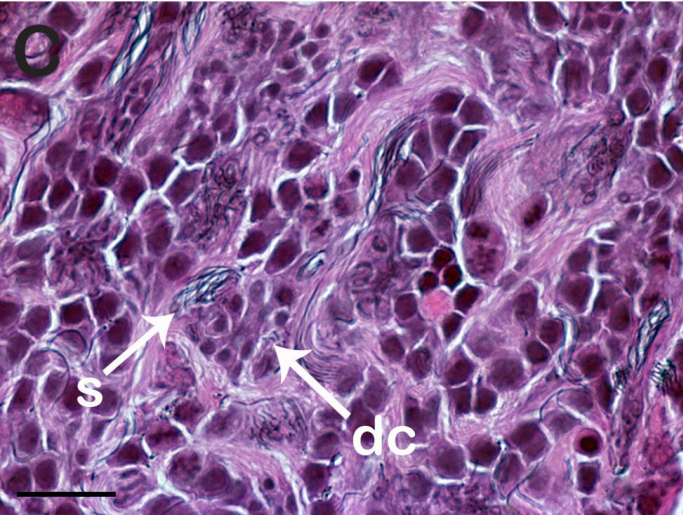
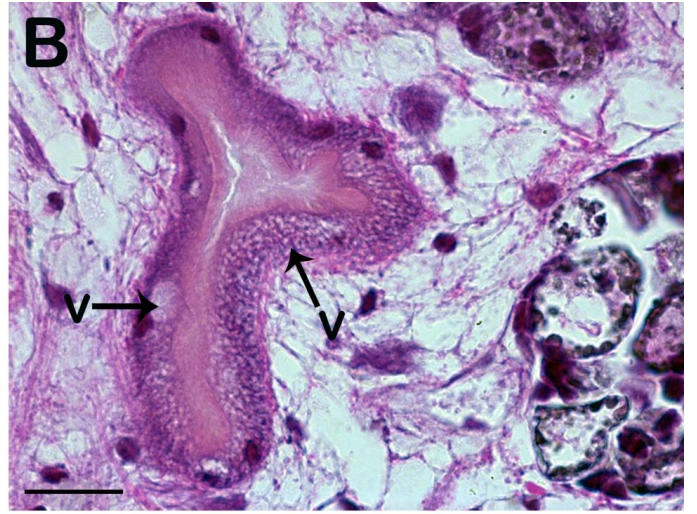
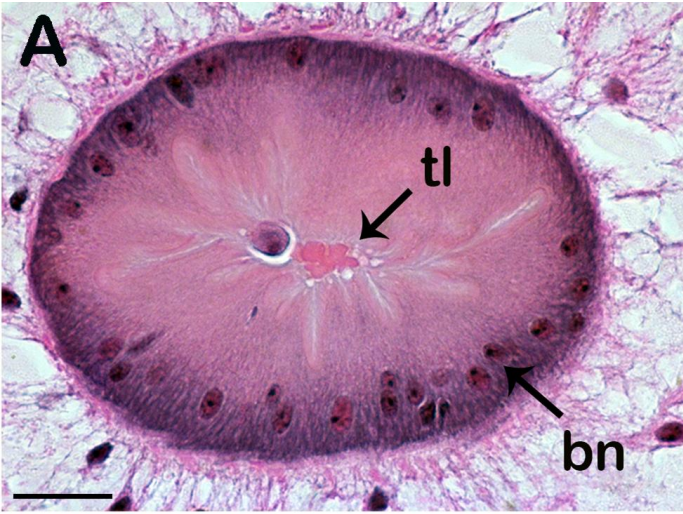


### 3.2 Histopatologia

O grupo controle possuiu o ceco formado por células cilíndricas com núcleos basais e células com um ou dois nucleolos (Figura 2A), enquanto o grupo exposto apresentava células epiteliais cecais vacuolizadas (Figura 2B). Os testículos continham estruturas em forma de roseta com feixes de espermatozóides com aparência normal no grupo controle (Figura 2C), mas após duas horas de exposição, a espermatogênese foi evidente nos testículos dentro da gônada devido à ruptura do parênquima testicular (Figura 2D). O tegumento do grupo controle apresentou estruturas bem definidas com sincício, lâmina basal, camadas musculares circulares e longitudinais, e tecido conjuntivo frouxo com células do parênquima preenchendo o interior do corpo do trematódeo (Figura 2E). Após duas horas de exposição, observou-se a alteração do tegumento, com estruturas parietais reduzidas e danificadas e camadas musculares interrompidas e desorganizadas. As células parenquimatosas associadas ao tegumento se mostraram desordenadas (Figura 2F).

**Figura 2:** Seções histológicas de *Echinostoma paraensei* com 14 dias pós-infecção corados em HE. **A** Grupo controle: Ceco com lúmen fino (tl) e células cilíndricas com núcleo basal (bn) com um ou dois nucleolos. **B** Grupo exposto por duas horas a 900 mg/L de Roundup®: células do ceco com presença de vacúolos (v). **C** Grupo controle: Testículos com aparência normal de divisão celular (dc) com feixe de esperma(s). **D** Grupo exposto por duas horas a 900 mg/L de Roundup®: ruptura do parênquima testicular (tp) evidenciando o processo de diferenciação (dp), com presença de esperma (s). **E** Grupo controle: Tegumento preservado com sincício (s), lâmina basal (bl), camada muscular circular (\* cm) e longitudinal (\* lm) e tecido conjuntivo frouxo com células do parênquima (pc). **F** Grupo exposto por duas horas a 900 mg/L de Roundup®: Tegumento alterado (ct) com células parenquimatosas desordenadas (pc). Barra: 50 µm.





Observou-se diferença significativa entre o controle e os grupos expostos na comparação das médias para a hipotrofia das células cecais, a distância entre a borda cecal e o lúmen, e o número de células do parênquima. No entanto, não foi observada diferença significativa na área cecal entre os dois grupos. Diferenças significativas também foram observadas para a espessura do tegumento, lâmina basal e o número de ácinos das glândulas vitelínicas (Tabela 1).

**Tabela 1:** Medições de cortes histológicos de seis espécimes de *Echinostoma paraensei* para avaliar os danos causados pelo herbicida Roundup®, realizado em duplicata.

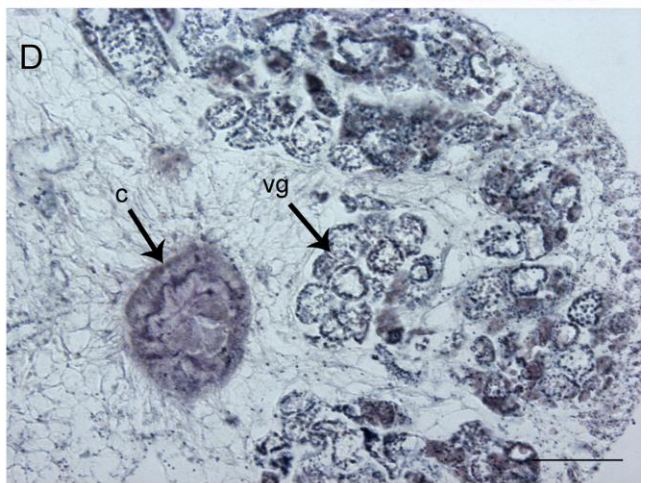
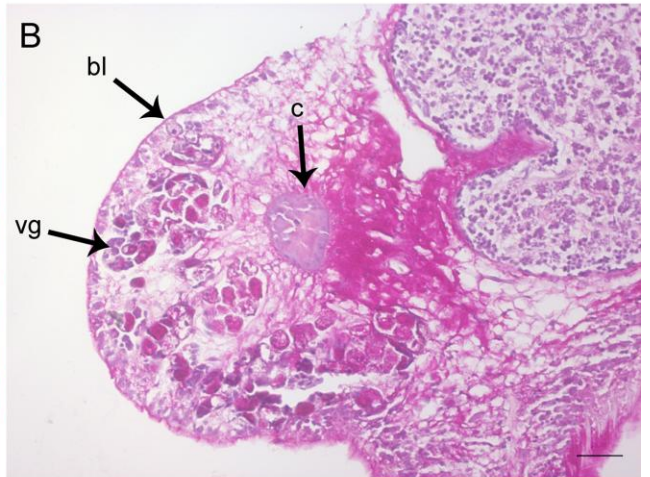
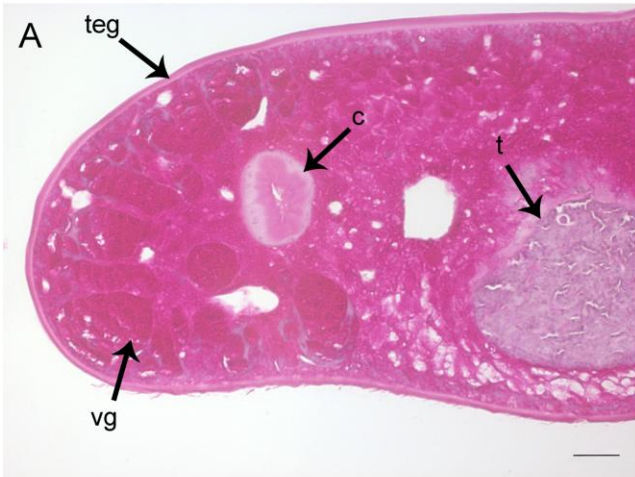
	Helmintos com 14 dias				
	Grupo controle	Grupo exposto (900 mg/L)			df
	Média±DP	Média±DP	T	p	
<b>Ceco</b>					
Área ( $\mu\text{m}^2$ )	6216,7 ± 2243,3	6950,3 ± 1294,8	0,69	0,5036	5
Área de hipotrofia celular ( $\mu\text{m}^2$ )	134,3 ± 77,7	2716,2 ± 1231,8	5,00	<0,01	5
Borda - lúmen ( $\mu\text{m}$ )	28,8 ± 5,6	14,2 ± 2,9	4,54	<0,01	5
Nº células parenquimais	23,3 ± 3,5	14,6 ± 2,6	4,24	<0,01	5
<b>Tegumento - Lâmina basal (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	8,7 ± 1,9	3,7 ± 0,8	4,84	<0,01	5
<b>Nº ácinos das glândulas vitelínicas</b>	17,2 ± 3,3	12,8 ± 3,3	5,70	<0,01	5



Além disso, após 2 h de exposição, as secções histológicas coradas com PAS apresentaram menor teor de glicídeo em relação ao grupo controle, principalmente no tecido conjuntivo ao redor do ceco e das glândulas vitelínicas, bem como nas ácinos das glândulas vitelínicas. A Lâmina basal se mostrou evidente devido a perda do tegumento (Figuras 3A-B). A espermatogênese não foi alterada após a observação histológica (Figura 3B). Pelo corante de reticulina de Gomori foi revelado perda de tegumento com lâmina basal deteriorada, ceco degenerado e células vitelínicas sem núcleos (Figuras 3C-D). Não foram observadas alterações nas fibras reticulares parenquimatosas dos grupos controle e experimental.

**Figura 3:** Secções histológicas de *Echinostoma paraensei* de 14 dias coradas em PAS e Reticulina de Gomori. PAS: **A** Grupo controle: presença de conteúdo glicídico intenso no parênquima e ácidos de glândulas vitelínicas (vg). Ceco (c), testículo (t) e tegumento (teg) preservados. **B** Grupo exposto por duas horas a 900 mg/L de Roundup®: diminuição do conteúdo glicídico no parênquima e nas glândulas vitelínicas (vg) com lâmina basal (bl) evidente pela perda de tegumento. Ceco (c). Reticulina de Gomori: **C** Grupo controle: Ceco (c) e glândulas vitelínicas (vg) com morfologia preservada. Lâmina basal evidente (bl). **D** Grupo exposto por duas horas a 900 mg/L de Roundup®: degeneração do ceco (c) e células vitelínicas (vg) que não apresentam núcleos. Barra: 50 µm.

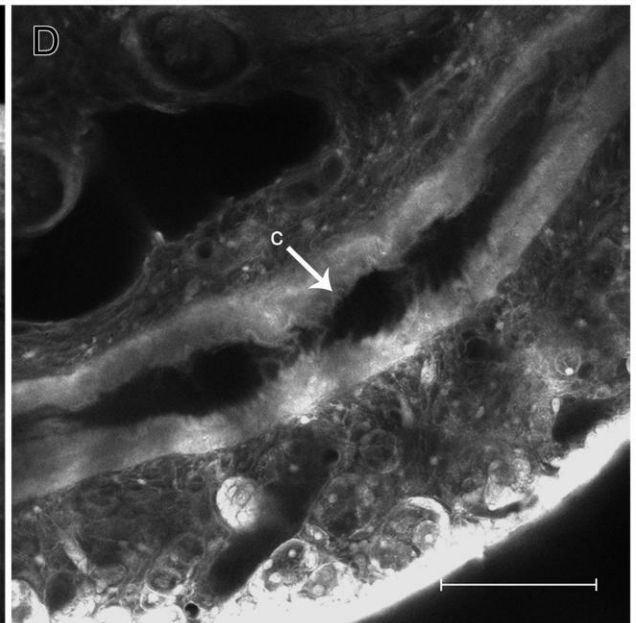
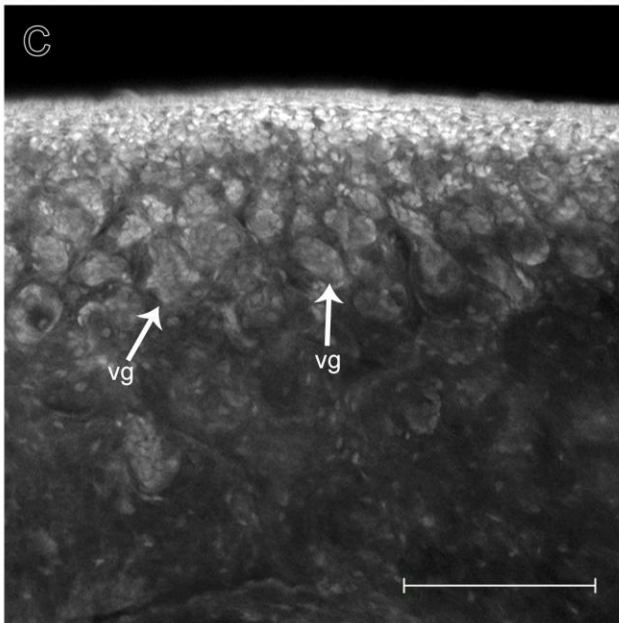
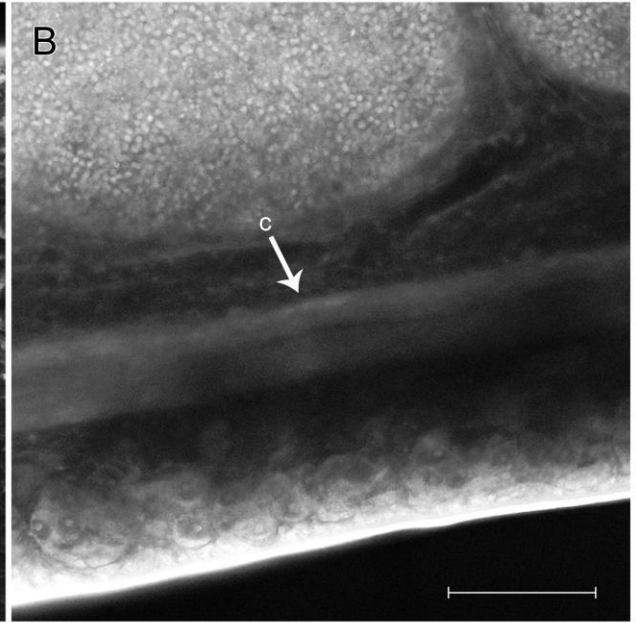
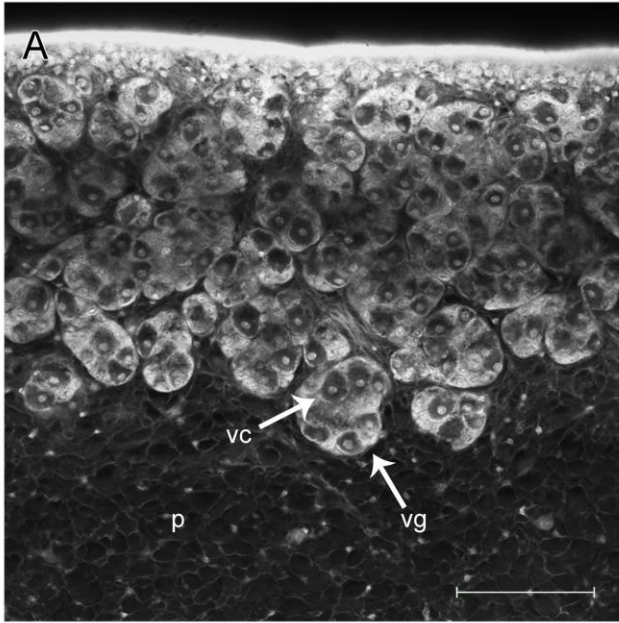




### **3.3 Microscopia a laser de varredura confocal (MLVC)**

A técnica de MLVC revelou mudanças principalmente para as glândulas vitelínicas e ceco. O grupo controle revelou ácinos das glândulas vitelínicas preservados com células vitelínicas apresentando núcleos com aspecto normal, bem como o parênquima do corpo (Figura 4A). O ceco se mostrou preservado com um lúmen estreito (Figura 4B). Após a exposição, os ácinos das glândulas vitelínicas estavam desorganizados com células revelando a perda de núcleos (Figura 4C) e o ceco estava alterado com dano epitelial, evidenciando um lúmen aparentemente dilatado (Figura 4D).

**Figura 4:** Imagens de microscopia a laser de varredura confocal de preparações de montagem completa de *Echinostoma paraensei* de 14 dias corado com Carmim clorídrico: **A** Grupo controle: Ácinos de glândulas vitelínicas preservadas (vg) com células vitelínicas (vc) com aspecto normal, bem como parênquima do corpo (p). **B** Grupo controle: Ceco com forma preservada com lúmen fino (c). **C** Grupo exposto por duas horas a 900 mg/L de Roundup®: Ácinos de glândulas vitelínicas com células com núcleos perdidos (vg). **D** Grupo exposto por duas horas a 900 mg/L de Roundup®: ceco com dano aparente ao epitélio cecal (c). Bar 100 µm.



#### 4. DISCUSSÃO

Em decorrência do acúmulo de conhecimento acerca dos efeitos de herbicidas em práticas agrícolas, tem-se verificado que seus efeitos não estão restritos às espécies alvo para as quais foram concebidos (Langiano et al., 2008; Lanctot et al., 2014). Desde então, evidências mostraram os efeitos do herbicida nos diversos níveis tróficos, incluindo helmintos parasitos. No entanto, ainda há pouca informação sobre esses efeitos e seus mecanismos de ação.

Evidências recentes mostraram os efeitos da exposição *in vitro* ao herbicida Roundup® Original sobre o parasito *E. paraensei*, cujo ciclo biológico requer o ambiente aquático. A exposição a baixas concentrações do herbicida pode levar a morte de estádios larvais como miracídios e cercárias, e prejudicar o desenvolvimento embrionário larval dentro dos ovos (Monte et al., 2016). Acredita-se que esses achados estejam relacionados principalmente à presença do surfactante na formulação comercial, taloamina polietoxilato (POEA), um emulsificante que facilita a entrada e difusão do glifosato através da parede celular das plantas para aumentar sua eficácia (Williams et al., 2000). Neste estudo, observaram-se alterações morfológicas e histopatológicas nas larvas recém desencistada, helmintos jovens e adultos, após exposição ao Roundup®. No entanto, poucos estudos morfológicos estão disponíveis sobre este herbicida no que diz respeito a helmintos parasitos (Monte & Maldonado, 2017).

Nossos resultados demonstraram que, no grupo controle, todos os espécimes apresentaram morfologia semelhante à descrita anteriormente por Maldonado et al. (2001a), como um corpo alongado e delgado com bordas laterais curvadas ventralmente nos eixos longitudinais, ampliando-se da ventosa ventral em diante. A menor concentração testada, entretanto, promoveu o dano da superfície tegumentar. Alterações semelhantes foram observadas após a exposição ao anti-helmíntico, praziquantel, na superfície de *E. paraensei*, incluindo inchaço e alterações pronunciadas da região peristômica, descamação e formação de vesículas (Ferraz et al., 2012; Gonçalves et al., 2013), sugerindo que o herbicida Roundup® Original possa atuar interrompendo a homeostase de cálcio, assim como demonstrado para o anti-helmíntico (Greenberg, 2005).

Da mesma forma, estudos *in vitro* com *Echinostoma caproni* e um trematódeo do gênero *Schistosoma*, também observaram danos e enrugamento do tegumento, contração corporal e presença de vesículas ao longo da superfície tegumentar após o tratamento com diferentes anti-helmínticos relacionados a alterações na atividade muscular (praziquantel, tribendimidina, albendazol e quinina) (Xiao et al., 2009; Panic et al., 2013). Alterações na atividade motora com contração intensa do corpo e perda da camada muscular subjacente ao tegumento também foram observadas em *E. paraensei*.

Tansatit et al. (2012), compararam os efeitos *in vitro* do triclabendazol e um derivado de artemisinina (artesanato) em *Fasciola gigantica* Cobbold, 1855 e observaram alterações morfológicas semelhantes de ambos os fármacos, consistindo principalmente em tumefação do tegumento com erupções e erosão. Esses achados também foram observados por Souza et al. (2017) usando larvas recém desencistadas de *E. paraensei* tratadas com artesunato. Embora as espécies químicas testadas nestes estudos tenham composições químicas diferentes, observaram-se alterações semelhantes em nosso estudo, indicando que essas substâncias atuam inicialmente sobre os mesmos alvos na superfície tegumentar, alterando a estabilidade da membrana. A composição comercial do agrotóxico testado neste estudo inclui o surfactante POEA, que pode alterar a integridade do tegumento. Isso pode estar relacionado a um desequilíbrio na osmose, resultando em um distúrbio do fluxo de íons através da membrana, como já observado para outras substâncias (Bricker et al., 1982; Mehlhom et al., 1983; Schmahl & Mehlhom, 1985; Sobhon et al., 1983., 1986).

As alterações histológicas causadas pela exposição *in vitro* ao herbicida, Norflurazon, na planária *Polycelis felina* Dalyell, 1814, revelaram danos à camada mucosa externa, epiderme e células parenquimatosas (Horvat et al., 2005). A degradação do tecido parenquimatoso com lesão celular também foi observada neste estudo, juntamente com danos no tegumento. Esses estudos sugerem potenciais efeitos citotóxicos desses herbicidas em platelmintos com conseqüente morte baseado na concentração a que foram expostos.

Em um estudo recente, o anelídeo *Eisenia fetida* Savigny, 1826, foi comparado histopatologicamente usando cinco agrotóxicos (inseticidas e



fungicidas), e os resultados verificaram o dano na camada muscular, resultando potencialmente em distúrbios do sistema nervoso (Rico et al., 2016). Embora esses estudos envolvessem outras classes de agrotóxicos, constatamos que o Roundup® Original levou a ruptura e desorganização das camadas musculares, movimentos espasmódicos e formação de um nó na região pós-acetabular após duas horas de exposição, sugerindo envolvimento do sistema nervoso. Mais estudos são necessários para esclarecer esses resultados.

Alguns estudos demonstraram que a exposição ao herbicida à base de glifosato diminui os níveis de glicogênio em diferentes organismos (Dornelles & Oliveira, 2014; Senhorin et al., 2014). Este polissacarídeo é essencial para o equilíbrio energético pois fornece uma reserva interna de energia, e sua depleção está associada ao estresse devido à exposição aos poluentes ambientais, uma vez que o aumento da demanda de energia ajuda o metabolismo envolvido na desintoxicação de xenobióticos (Alkahlen, 1996; Moyes & Schulte, 2010). No presente estudo foi avaliada a exposição aguda ao herbicida e observada perda de conteúdo glicídico em *E. paraensei*, que pode incluir glicogênio, glicoproteínas e glicolípidos nas células e membranas celulares (Vutukuru, 2005). Isso pode ocorrer a partir da tentativa do parasito de eliminar o poluente tóxico conforme descrito anteriormente.

Poucos estudos relatam os efeitos causados por herbicidas à base de glifosato no tecido conjuntivo, especificamente nas fibras reticulares que são formadas principalmente por fibras de colágeno tipo III. As observações histológicas de células de fígado de roedores expostas à maior concentração de herbicida à base de glifosato, encontraram aumento de tecido conjuntivo e deposição de fibras de reticulina, sugerindo difusão modificada de substâncias e insuficiência hepática (Benedetti et al., 2004). Nossos dados não mostraram alterações de fibras reticulares nos helmintos expostos ao Roundup®, sendo relacionado ao curto período de exposição, com tempo insuficiente para o aumento da deposição de fibras de colágeno tipo III.

Embora diferentes estudos tenham avaliado os efeitos do Roundup® em outros organismos modelo, a maioria desses estudos enfocou o impacto biológico e

fisiológico deste herbicida (Adam et al., 1997; Langiano et al., 2008; Lanctot et al., 2014), e poucos estudos existem quanto aos efeitos ultraestruturais.

## **5. CONCLUSÃO**

A exposição ao Roundup® Original em condições experimentais é capaz de promover alterações morfológicas tegumentares e ultraestruturais. Considerando a predisposição à exposição de *N. squamipes* infectado por *E. paraensei* ao herbicida em questão, enfatizamos a necessidade de estudos para avaliar o impacto de tais resíduos frente aos helmintos e seus hospedeiros.



## CAPÍTULO IV

### **ALTERAÇÕES NOS HEMÓCITOS DE *Biomphalaria glabrata* INFECTADOS COM *Echinostoma paraensei* E EXPOSTOS AO HERBICIDA GLIFOSATO**

Monte TCC, Chometon TQ, Moura VS, Vaconcellos MC, Garcia J, Ferraz-Nogueira R, Bertho AL, Maldonado AJ, Faro MJ. Changes in hemocytes of *Biomphalaria glabrata* infected with *Echinostoma paraensei* and exposed to the herbicide glyphosate. *J Invert Pathol* (Artigo submetido - JIP\_2018\_188). (Anexo IV).

## 1. INTRODUÇÃO

O molusco água doce, *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (Gastropoda: Planorbidae), é um hospedeiro intermediário importante para os estádios de desenvolvimento larval dos diferentes platelmintos parasitos, incluindo *Schistosoma mansoni* e *Echinostoma paraensei* (Lie & Basch, 1967; Loker et al., 1986; Paraense, 2001). Este molusco possui uma ampla distribuição geográfica no Brasil, encontrado em 16 estados brasileiros além do Distrito Federal (Souza et al., 2001; Carvalho et al., 2008).

O trematódeo digenético *E. paraensei* foi isolado pela primeira vez a partir de moluscos *B. glabrata* naturalmente infectados provenientes do estado de Minas Gerais, Brasil (Lie & Basch, 1967). Desde então, tem sido utilizado como um organismo modelo adequado (Fried & Graczyk, 2000; Toledo et al., 2014) para elucidar diferentes características biológicas, tais como aspectos da relação parasito-hospedeiro intermediário e definitivo (Maldonado et al., 2001b; Pinheiro et al., 2009; Garcia et al., 2011; Garcia et al., 2012; Tunholi et al., 2013; Tunholi et al., 2016) e elucidação do desencistamento *in vitro* de metacercárias (Souza et al., 2013). Alterações morfológicas decorrentes da exposição a compostos com potencial anti-helmíntico também foram demonstradas utilizando este helminto (Ferraz et al., 2012; Gonçalves et al., 2013; Souza et al., 2017), bem como os efeitos de agrotóxico sob condições experimentais (Monte et al., 2016; Monte et al., 2018).

O desenvolvimento do parasito no molusco é uma etapa obrigatória para o sucesso da infecção, resultando na fase parasitária infectante para o hospedeiro vertebrado. Esse processo depende de vários fatores, como encontrar e penetrar no hospedeiro; adaptação às condições de estresse com variações de fatores fisiológicos (osmolaridade, pH, concentração de O<sub>2</sub>); aquisição de nutrientes para o crescimento e reprodução; e evasão do sistema de defesa do hospedeiro (Negrão-Correa et al., 2007; Cavalcanti et al., 2012).

A defesa interna de espécies de invertebrados é implementada através de um sistema imunológico não linfóide que é capaz de identificar e eliminar os potenciais patógenos de forma muito eficaz (Pipe & Cole, 1995). O reconhecimento do não-próprio e subsequente ativação imunológica é mediado por lectinas, inicialmente

referidas como fatores humorais ou presentes na superfície dos hemócitos (Schultz & Adema, 2017). O sistema interno de defesa (SID) do molusco é composto de componentes solúveis de hemolinfa (proteínas relacionadas ao fibrinogênio) e hemócitos, células circulantes, que possuem propriedades fagocíticas (Lockyer et al., 2007; Cavalcanti et al., 2012). Os hemócitos circulantes no gênero *Biomphalaria* consistem, em pelo menos, duas subpopulações de células, hialinócitos e granulócitos, no entanto, também foi relatada a presença de células blásticas em *B. glabrata* e *Biomphalaria straminea* (Lo Verde et al., 1982; Lie et al., 1987; Barracco et al., 1993; Cavalcanti et al., 2012). Essas subpopulações apresentam morfologia e conteúdo enzimático variável, possuindo diferentes características de adesão e fagocitose (Van der Knaap & Loker, 1990, Matricon-Gondran & Letocart, 1999).

O sistema imunológico dos moluscos é um dos sistemas fisiológicos mais sensíveis aos poluentes, o qual pode atuar na função de proteção, induzindo imunossupressão e diminuindo a resistência parasitária (Wong et al., 1992; Fournier et al., 2000). Fatores externos e internos, como xenobióticos e características intrínsecas do hospedeiro, respectivamente, podem influenciar o progresso do parasitismo, afetando a densidade, as funções e os padrões de resposta dos hemócitos (Snieszko, 1974; Livingstone et al., 2000; Mohamed, 2011).

No Brasil, o herbicida glifosato, ácido N-(fosfometil)-glicina (Roundup® Original, Mosanto do Brasil, Ltda., registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA): n ° 00898793), é amplamente utilizado na agricultura para o controle de ervas daninhas. Este herbicida atua sobre o sistema enzimático das plantas, inibindo a via essencial do ácido chiquímico, que está envolvido no metabolismo dos aminoácidos aromáticos (Amarante Junior et al., 2002, Schonbrunn et al., 2001). Devido à sua alta solubilidade em água, este agrotóxico pode afetar organismos não-alvo, como peixes (Lushchark et al., 2009), anfíbios (Lanctôt et al., 2014; Navarro-Martin et al., 2014), mamíferos (Cattani et al., 2014), estádios de vida livre de helmintos (Monte et al., 2016; Monte & Maldonado, 2017) e moluscos, neste último caso sendo capaz de causar alterações bioquímicas relacionadas aos mecanismos de desintoxicação, como observado em *Limnoperna fortunei* Dunker, 1857 (mexilhão dourado), provocando uma diminuição na atividade de enzimas específicas que desempenham um papel importante na desintoxicação agroquímica através da interação com agrotóxicos organofosfatos, tornando moluscos mais sensíveis a contaminantes ambientais (Iummato et al., 2018).

Os moluscos são membros onipresentes de comunidades aquáticas e têm múltiplos papéis nestes ecossistemas (Gustafson et al., 2015). O habitat natural de *B. glabrata* consiste em ambientes de água doce, como riachos e sistemas de águas rasas, tornando esses organismos mais vulneráveis à exposição a agrotóxicos e / ou seus produtos de degradação no meio ambiente, tornando-os capazes de prejudicar não apenas o sistema imunológico dos moluscos mas também a interação parasito-hospedeiro (Mohamed, 2011). Devido a isso, este estudo investigou a exposição ao herbicida à base de glifosato (Roundup® Original) em moluscos *B. glabrata*, infectados ou não pelo trematódeo *E. paraensei*, avaliando mudanças no SID do molusco e, conseqüentemente, no parasitismo.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Manutenção de *B. glabrata* e *E. paraensei* em condições laboratoriais**

A criação em laboratório de espécimes de *B. glabrata* provenientes do município de Sumidouro, estado do Rio de Janeiro (22°02'46 "S, 42°41'42"W) é regularmente mantida no Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios (LABPMR) (Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil) (Garcia et al., 2011). Os moluscos adultos com 90 dias de idade (diâmetro de 8-12 mm) foram mantidos em aquário de plástico (5L) com uma camada de argila misturada com carbonato de cálcio (10:1) e água desclorada, que foi trocada a cada 15 dias, com uma densidade de 50 indivíduos por aquário. A temperatura da água foi mantida a  $25 \pm 1$  °C. Os moluscos foram alimentados com folhas frescas *Lactuca sativa* (alface) *ad libitum* (Paraense e Côrrea, 1989) (Figura 1).



**Figura 1:** Manutenção de moluscos *Biomphalaria glabrata* em laboratório (Fonte: Moura, 2017)

O isolado *E. paraensei* foi obtido de roedores silvestres, *Nectomys squamipes*, naturalmente infectados e também coletados no município de Sumidouro (Maldonado et al., 2001a). O ciclo de vida de *E. paraensei* é mantido no LABPMR através de passagens em *Mesocricetus auratus* (hamsters) e *B. glabrata* como hospedeiros definitivos e intermediários, respectivamente (Garcia et al., 2011). Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as regras do Comitê de Ética ao Uso de Animais (CEUA) da Fundação Oswaldo Cruz (Permissão: LW-51/14).

## 2.2 Infecção experimental

Para obter os moluscos infectados com *E. paraensei*, os ovos uterinos foram recuperados de helmintos adultos, obtidos do intestino delgado de hamsters, na terceira semana de infecção e incubados em água desclorada a 26 °C durante 14 dias, no escuro. Após este período, os ovos foram expostos à luz sob uma lâmpada incandescente de 100W para estimular a eclosão de miracídios. Os espécimes de *B. glabrata* foram infectados individualmente com 30 miracídios *overnight*, e após 40 dias, expostos à luz artificial durante 4 h para induzir a emergência cercariana (Garcia et al., 2011).

### 2.3 Exposição ao herbicida

As concentrações utilizadas nos experimentos foram preparadas a partir de Roundup® Original (480 g/L de sal de isopropilamina N- (fosfometil) glicina; 360 g/L de equivalente ácido (fosfometil) glicina, 684 g/L de ingredientes inertes; Monsanto do Brasil Ltda.; N° Lote: RRO01/1307-00). Diluições seriadas do herbicida (360 mg/L - 36 mg/L) em água desclorada foram preparadas para determinar a concentração letal média (CL<sub>50</sub>), e selecionar a concentração experimental. A partir de 1,0 mL do Roundup® Original elevou-se até 1000 mL com água desclorada, em um balão volumétrico, obtendo-se a concentração de 0,1 %, equivalente a 360 mg/L de ingrediente ativo (i.a.) de glifosato (solução-mãe). A partir da solução-mãe, foram realizadas diluições sucessivas para se obter as concentrações de 0,09; 0,08; 0,07; 0,06; 0,05; 0,04; 0,03; 0,02, 0,018; 0,016; 0,014; 0,012 e 0,01 (%) com volume final de 1000 mL em cada solução. Para cada bateria de teste, foi utilizado um controle com água desclorada, com o mesmo volume das soluções. Este volume foi dividido em partes iguais de 500 mL por frasco com 10 moluscos em cada, e a mortalidade foi analisada após 24 h de exposição. Com os dados obtidos da mortalidade dos moluscos, a CL<sub>50</sub> foi determinada através da análise Probit (Finney, 1971).

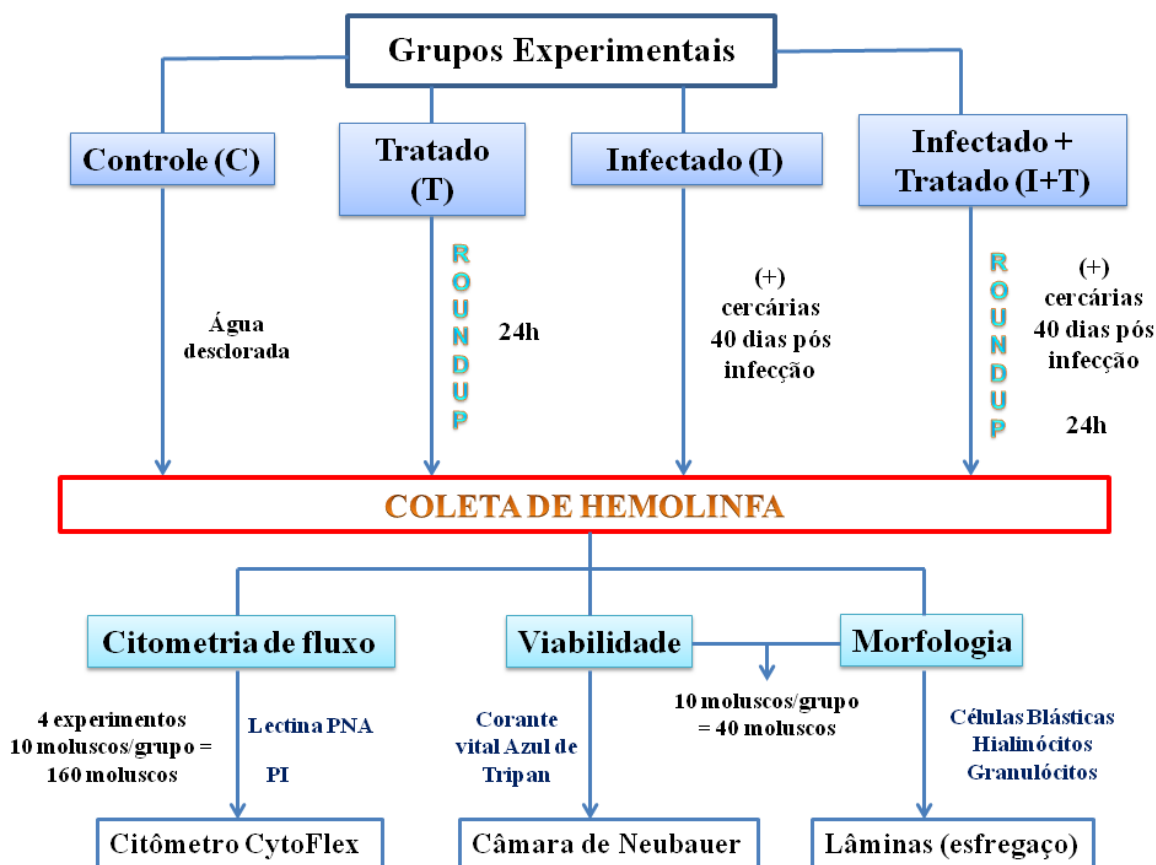
Os grupos tratados com o herbicida foram expostos a uma concentração equivalente a 36 mg/L (0,01%) de i.a. de glifosato. Os moluscos foram expostos por 24 h à solução herbicida e os espécimes de grupos não tratados foram expostos apenas a água desclorada, pelo mesmo período.

### 2.4 Desenho experimental

Quatro grupos experimentais foram empregados neste estudo: grupo não infectado e não tratado, chamado de grupo controle (C); grupo infectado com *E. paraensei* (I) (40 dias de infecção), grupo tratado com Roundup® por 24 h (T) e grupo infectado com *E. paraensei* (40 dias de infecção) seguido de tratamento com Roundup® por 24 h (I+T). Quatro experimentos de citometria de fluxo foram realizados, sendo utilizados dez moluscos para cada grupo experimental (160

moluscos no total) e, para avaliar a viabilidade e morfologia dos hemócitos, dez moluscos foram utilizados por grupo (40 moluscos no total) (Figura 2).

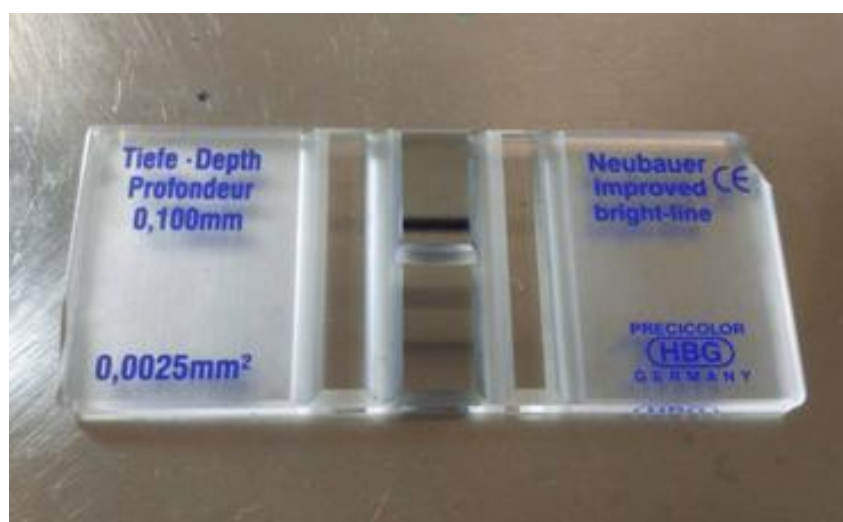
Os indivíduos de cada grupo tiveram sua hemolinfa coletada 40 dias após a infecção com *E. paraensei*, como descrito anteriormente por Bezerra et al. (1997). Resumidamente, a concha foi seca com papel absorvente e realizada punção na cavidade pericárdica usando uma seringa de insulina e uma agulha 26 G 1/2 (0,45 x 13 mm). As hemolinfas foram então diluídas e submetidas a cada protocolo experimental (Figura 2).



**Figura 2:** Grupos experimentais e análises empregadas no estudo.

## 2.5 Viabilidade dos hemócitos

Hemócitos vivos foram avaliados pelo método de exclusão do corante vital Azul de Tripán. A hemolinfa recém recuperada foi diluída no corante (1:1) e, em seguida, 10  $\mu\text{L}$  foram diretamente depositados na câmara de Neubauer, com a análise sendo realizada nos quatro quadrantes laterais da câmara, à temperatura ambiente, sob microscopia de luz (Zeiss Stemi SV6) com aumento de 40x (Martins-Souza et al., 2009), e a concentração de células foi corrigida para o volume de 1 mL de hemolinfa (Alves & Moraes, 1998) (Figura 3).



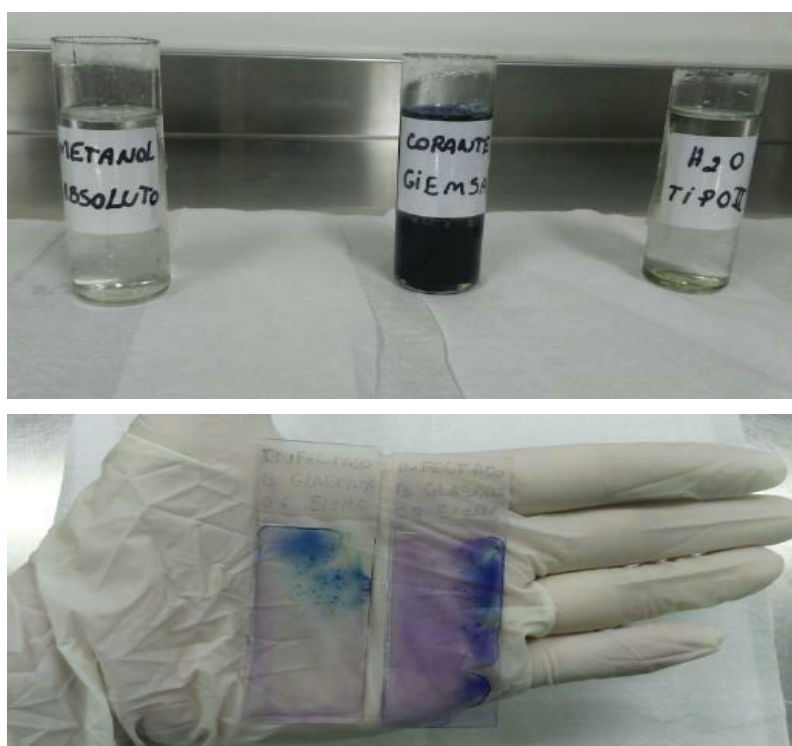
**Figura 3:** Câmara de Neubauer espelhada utilizada para análise da viabilidade dos hemócitos (Fonte: Moura, 2017)

## 2.6 Diferenciação morfológica de hemócitos

Para a diferenciação morfológica dos hemócitos, a hemolinfa recém recuperada foi fixada em formol Millonig de Carson (1:1), a fim de manter a integridade celular. Depois de fixada, 50  $\mu\text{L}$  de hemolinfa foi colocada diretamente sobre uma lâmina de vidro e realizado o esfregaço, deixando-o secar sob condições de laboratório, por 24 h. Em seguida, o material foi pós-fixado em metanol absoluto e corado com Giemsa (diluído 2: 8 em água destilada), por 5 min em cada etapa. Após



isso, as lâminas foram rapidamente lavadas com água Tipo II (Cavalcanti et al., 2012; Mohamed et al., 2011). As lâminas foram então montadas em goma de Dammar com xileno e observadas ao microscópio de luz (Zeiss Stemi SV6) com um aumento de 100x. A leitura das lâminas (esfregaço) foi realizada em uma área correspondente a 10% (120 mm<sup>2</sup>) do tamanho da lamínula utilizada (24x50 mm=1.200 mm<sup>2</sup>). As características morfológicas foram baseadas naquelas descritas por Cavalcanti et al. (2012). As imagens foram capturadas em câmera Zeiss Axio Cam MRc e analisadas usando o software Axio Zen 2 lite (Figura 4).

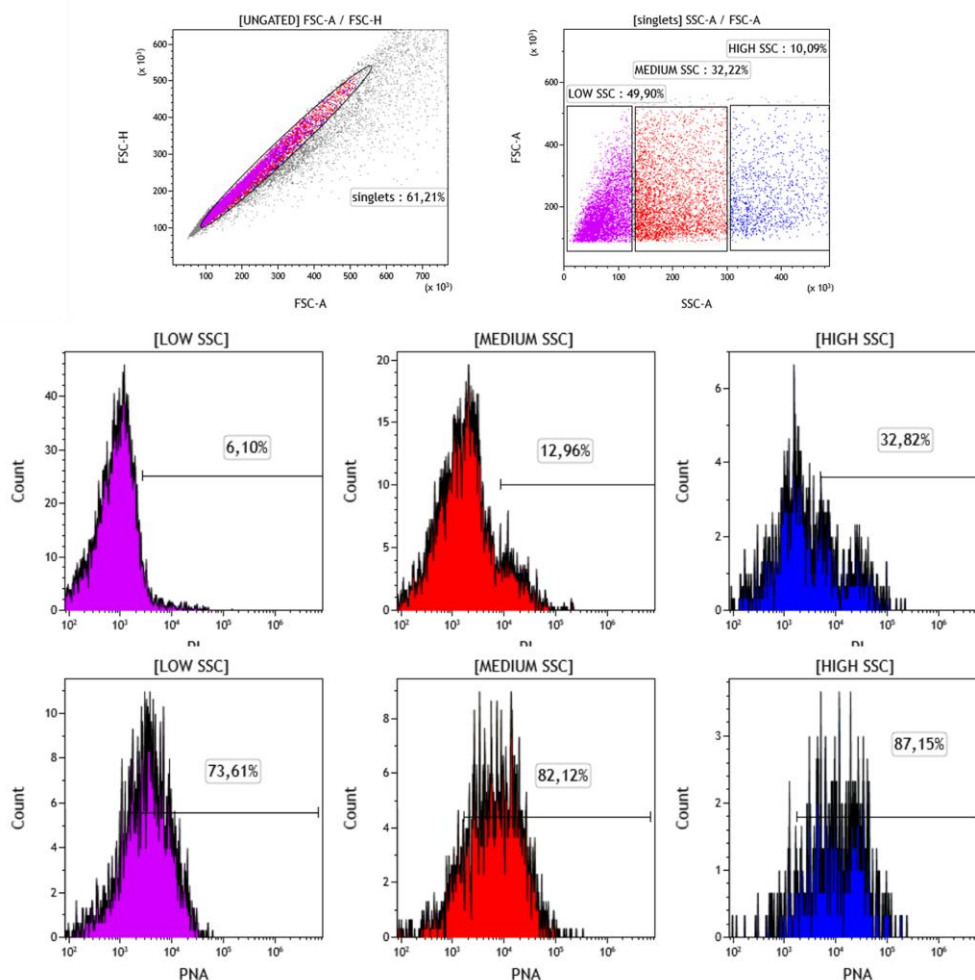


**Figura 4:** Procedimento de preparação das lâminas para a diferenciação morfológica dos hemócitos (Fonte: Moura, 2017).

## 2.7 Análise de citometria de fluxo

As amostras de hemolinfa foram coletadas de 10 moluscos, diluídos 1:1 com solução salina balanceada de Chernin (SSBC) e agrupados em tubos Eppendorf de 1,5 mL, mantendo-os no banho de gelo durante todo o processo (hemolinfa total). A morfologia, a viabilidade e os perfis de expressão das lectinas foram determinados

por um protocolo de coloração por citometria de fluxo estabelecido para o presente estudo: dois tubos com 200 µL de hemolinfa total foram incubados respectivamente com 100 µL de iodeto de propídio (PI) (100 µg / mL, Sigma Aldrich, EUA) ou 5 µL de lectina PNA-AlexaFluor488 (Life Technologies, EUA), por 20 min a 4°C, no escuro. Em seguida, as amostras foram ressuspensas com 200µL de CBSS e imediatamente submetidas à aquisição no citômetro de fluxo CytoFlex (Beckman Coulter Life Sciences, IN, EUA). A aquisição de 20 mil eventos de constituintes celulares da hemolinfa total foi realizada utilizando-se as configurações do citômetro de fluxo para leitura dos sinais de fluorescência do FITC e PI, através dos filtros BP 525/40 e 585/42, respectivamente. A aquisição foi feita usando o software CytoExpert ver.1.2 para determinar as frequências de células mortas (incorporação de PI) e de hemócitos expressando PNA. As análises de citometria de fluxo foram feitas utilizando o software Kaluza 1.5 (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, EUA) empregando a seguinte estratégia de análise: inicialmente foi criado um gráfico de distribuição de pontos (*dot-plot*) com parâmetros FSC-A vs FSC-H para fornecer a exclusão de *doublet* (Figura 5A). Depois de controlar os eventos de *singlets*, três subpopulações de hemócitos foram definidas com base na granularidade dos hemócitos em um gráfico de pontos de dispersão lateral (*side scatter*) vs dispersão para frente (*forward scatter*) (SSC vs. FSC) (escala x 10<sup>3</sup> linear). Três regiões foram criadas em torno de granularidade baixa (canais SSC entre 20-140), média (canais SSC entre 150-290) e alta (canais SSC entre > 300) (Figura 5B). A viabilidade de cada subpopulação de hemócitos foi avaliada em histogramas de PI baseados em *gates* criados na Figura 5B (Figuras 5C, 5D e 5E). Simultaneamente, histogramas de PNA (Filtro 525/40 BP - canal FITC-H) foram usados para avaliar as frequências de cada subpopulação de hemócitos expressando PNA (Figura 5F, 5G e 5H). Quatro repetições de experimentos de citometria de fluxo foram realizados.



**Figura 5:** Estratégia de *gate* de citometria de fluxo para análise de hemócitos em moluscos *Biomphalaria glabrata*. (A) diagrama de pontos FSC-A vs FSC-H, para exclusão de *doublets* (*singlets gate*); (B) gráfico de pontos de morfologia (SSC-A versus FSC-A). Três regiões foram criadas em torno de granularidade baixa (canais SSC entre 20-140), média (canais SSC entre 150-290) e alta (SSC canais entre > 300) SSC; (C, D e E) histogramas de fluorescência relativos à incorporação de PI (PE-H) por subpopulações de SSC baixa, média e alta, respectivamente; e (F, G e H) em relação à coloração com PNA (FITC-H). Esses gráficos são representativos para os 4 experimentos.

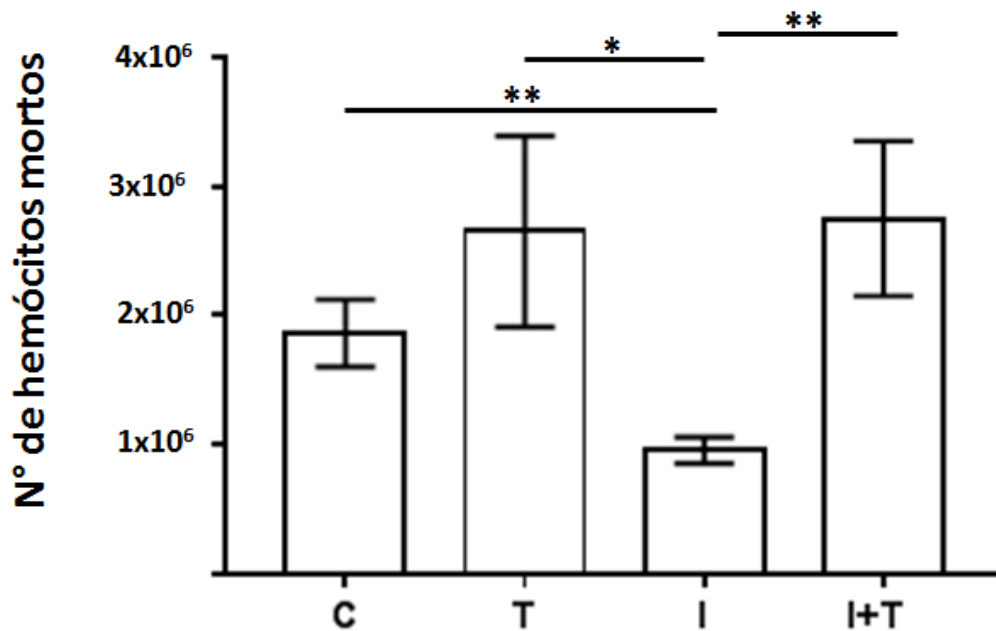
## **2.8 Análise estatística**

Os resultados obtidos a partir da análise da viabilidade celular (câmara de Neubauer), a diferenciação morfológica dos tipos de hemócitos e a análise da citometria de fluxo foram expressos como média  $\pm$  erro padrão. Todos os dados foram testados para distribuição normal usando o teste de Shapiro-Wilk. O teste T foi utilizado para determinar as diferenças entre as médias, para os dados com distribuição normal, enquanto o teste de Mann Whitney foi utilizado para dados que não eram normalmente distribuídos. A análise foi realizada utilizando o software InStat, GraphPad Prism v.7.00. Os valores com  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

## **3. RESULTADOS**

### **3.1 Viabilidade de hemócitos pela câmara de Neubauer**

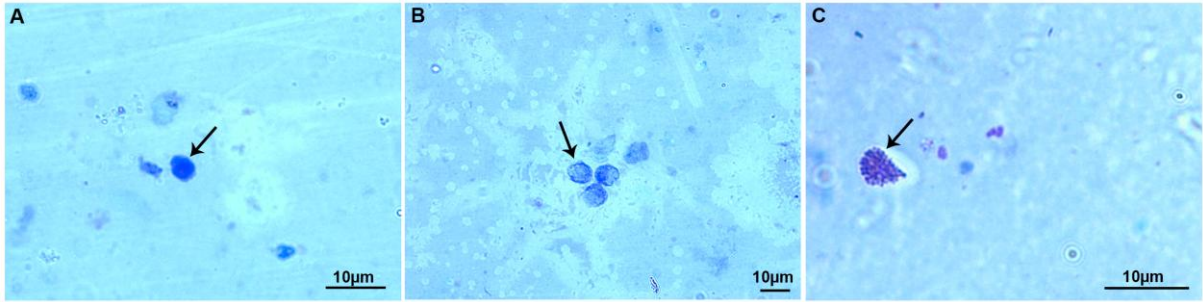
Um número total maior de células foi observado para o grupo tratado, seguido pelos grupos infectado + tratado, controle e infectado. Avaliamos a viabilidade dos hemócitos em cada grupo experimental e observamos uma menor porcentagem de células não viáveis no grupo infectado (I) e maior nos grupos tratado (T) e infectado + tratado (I + T), que mostraram uma porcentagem similar de morte celular entre eles. Comparando cada grupo entre si, observamos diferenças significativas, na porcentagem de hemócitos não viáveis, entre I e C ( $p = 0,0047$ ;  $t = 3,23$ ;  $df = 18$ ); I e T ( $p = 0,0358$ ;  $t = 2,27$ ;  $df = 18$ ); Grupos I e I + T ( $p = 0,0087$ ;  $t = 2,93$ ;  $df = 18$ ) (Figura 6).



**Figura 6:** Análise do número de hemócitos mortos, de dez moluscos de cada grupo experimental (n = 40), através do método de exclusão do corante vital Azul de Tripán, pela câmara de Neubauer. Os dados estão representados como média ± erro padrão. Houveram diferenças nas porcentagens de hemócitos mortos entre os grupos estudados (teste paramétrico: Test T). \* p <0,05 ; \*\*p <0,01.

### 3.2 Diferenciação morfológica de hemócitos por microscopia

Três tipos de células foram identificados pela avaliação microscópica: células blásticas (Bl), que são hemócitos pequenos, com o núcleo preenchendo quase todo o diâmetro da célula; hialinócitos (Hi), células de tamanho intermediário com um pequeno núcleo centralizado ou na periferia, sendo várias observadas no processo de divisão; e granulócitos (Gr), células que possuem vários grânulos visíveis em seu citoplasma (Figura 7).



**Figura 7:** Diferenciação morfológica de hemócitos de dez moluscos *Biomphalaria glabrata* de cada grupo experimental (n = 40): Controle (C); Tratado (T); Infectado (I); Infectados e Tratados (I + T), por microscopia ótica - **(A)** células blásticas (Bl); **(B)** Hialinócitos (Hi) e **(C)** Granulócitos (Gr), usando um microscópio Zeiss Stemi SV6 (1000X).

Analisando o número e os tipos de hemócitos em cada grupo, foi possível verificar que o grupo I + T apresentou a maior quantidade de todos os tipos de hemócitos, seguido dos grupos C, T e I. Encontramos diferenças entre todos os tipos de células (Bl, Hi, Gr), sendo os hialinócitos as células mais numerosas encontradas em todos os grupos experimentais. No grupo controle, foram observadas diferenças significativas entre os tipos de hemócitos (Bl - Hi:  $p < 0,0001$ ;  $t = 7,276$ ;  $df = 18$  / Bl - Gr:  $p = 0,0006$ ;  $t = 4,173$ ;  $df = 18$  / Hi - Gr:  $p < 0,0001$ ;  $t = 8,062$ ;  $df = 18$ ). Os mesmos resultados foram observados para os outros grupos experimentais (T: Bl-Hi:  $p < 0,0001$ ; Bl-Gr:  $p < 0,0001$ ; Hi-Gr:  $p < 0,0001$  / I: Bl-Hi:  $p < 0,0001$ ; Bl-Gr:  $p = 0,0006$ ; Hi-Gr:  $p < 0,0001$  / I+T: Hi-Bl:  $p < 0,0001$ ; Hi-Gr:  $p < 0,0001$ ; Bl-Gr:  $p < 0,0001$ ) (Tabela 1).

Quando comparamos a quantidade de cada tipo de hemócito (Bl, Hy, Gr) entre os grupos experimentais (C, T, I, I + T), os hialinócitos foram o único tipo celular a mostrar diferenças entre todos os grupos. (C-I:  $p < 0,05$  / T-I:  $p < 0,05$  / C - I + T:  $p < 0,001$  / T - I + T:  $p < 0,001$  / I - I + T:  $p < 0,0001$ ) (Figura 8).

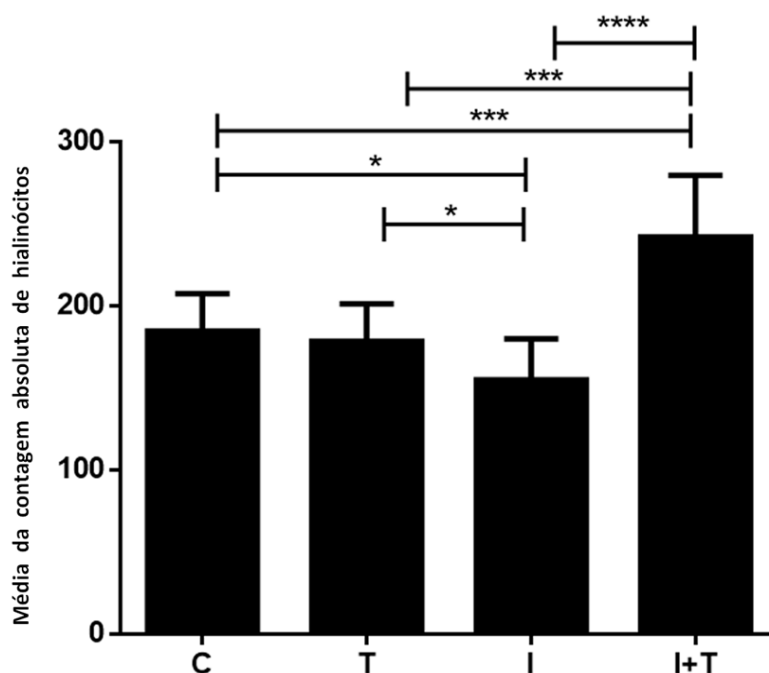
**Tabela 1:** Média da contagem absoluta dos diferentes tipos de hemócitos circulantes, em 50 microlitros, de *Biomphalaria glabrata* tratados ou não ao Roundup® Original e/ou infectados com *Echinostoma paraensei*. Os dados são apresentados como média ± erro padrão (n=10).

Grupos exp. <sup>c</sup>	Números dos tipos de hemócitos <sup>b</sup>		
	Bl	Hi	Gr
	Média ± Erro padrão		
Controle	170 ± 3,7 <sup>a</sup>	1848 ± 22,8	13 ± 0,4
Tratado (Roundup®)	103 ± 1,4	1786 ± 22,8	10 ± 0,3
Infectado ( <i>E. paraensei</i> )	94 ± 2,2	1552 ± 24,9	11 ± 0,4
Inf + Tratado	193 ± 3,7	2423 ± 37,7	10,1 ± 0,3

a - Média ± erro padrão de contagem absoluta (n=10)

b - (Bl) células blásticas; (Hi) Hialinócitos; (Gr) Granulócitos

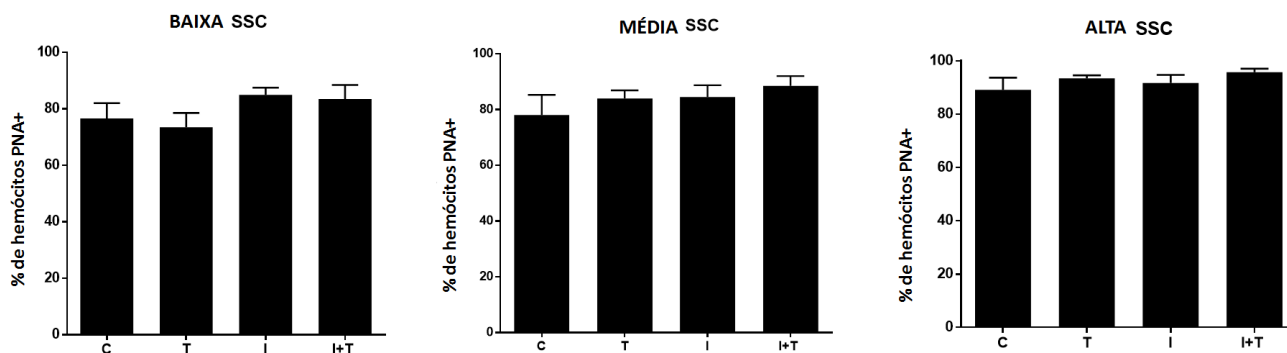
c - Tratado com herbicida e / ou infectado com *Echinostoma paraensei*



**Figura 8:** Diferenças na média da contagem absoluta de hialinócitos em 50 microlitros entre os quatro grupos experimentais (C = controle; T = tratado; I = infectado; I + T: infectado e tratado). \* p <0,05; \*\*\* p <0,001; \*\*\*\* p <0,0001.

### 3.3 Citometria de fluxo

Analisando os parâmetros morfológicos através da citometria de fluxo, identificamos três subpopulações de hemócitos definidas por granularidades diferentes no *dot-plot side scatter* (SSC) versus *forward scatter* (FSC) (Figura 5B). Posteriormente, criamos três regiões denominadas baixa, média e alta, respectivamente, com base em suas distribuições de granularidade (SSC). Toda a análise citométrica de fluxo foi delimitada em cada região definida. Em relação as frequências de células marcadas com PNA-FITC, observamos frequências altas em todas as subpopulações de hemócitos analisadas, em todos os grupos estudados, sem diferença entre elas (Figura 9).

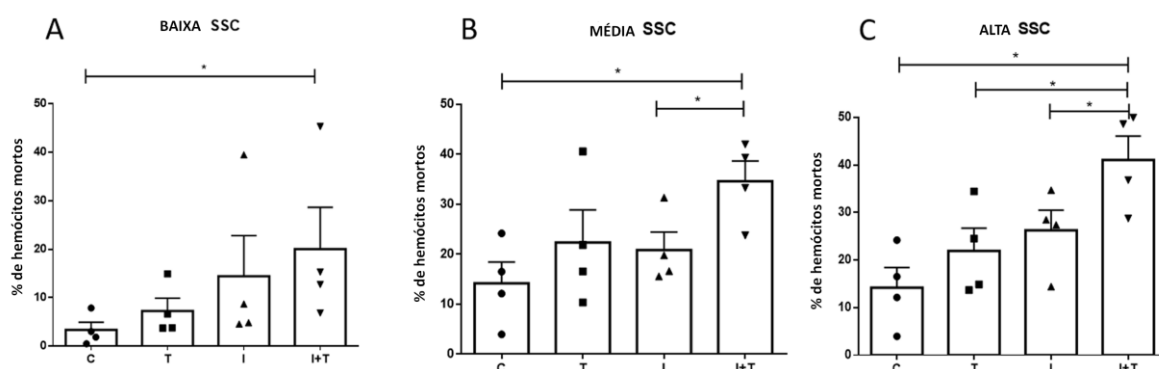


**Figura 9:** Análises de citometria de fluxo de três subpopulações celulares - Baixa, Média e Alta. Cada barra representa as porcentagens (%) de hemócitos marcados com PNA nos quatro grupos experimentais: Controle (C); Tratado (T); Infectado (I); Infectado e Tratado (I + T). Os dados estão representados como média  $\pm$  erro padrão das subpopulações de hemócitos. Não houve diferenças nas porcentagens de hemócitos entre cada grupo estudado (teste não paramétrico de Mann-Whitney).  $p > 0,05$ .

Determinando a viabilidade celular pela incorporação de PI, observamos em todas as subpopulações celulares, que o grupo I + T apresentou maiores frequências de células mortas quando comparado ao grupo C (baixa SSC:  $p = 0,028$   $U = 1$ ; média SSC:  $p = 0,028$   $U = 1$ ; alta SSC:  $p = 0,014$   $U = 0$ ) (Figuras 10A, 10B e

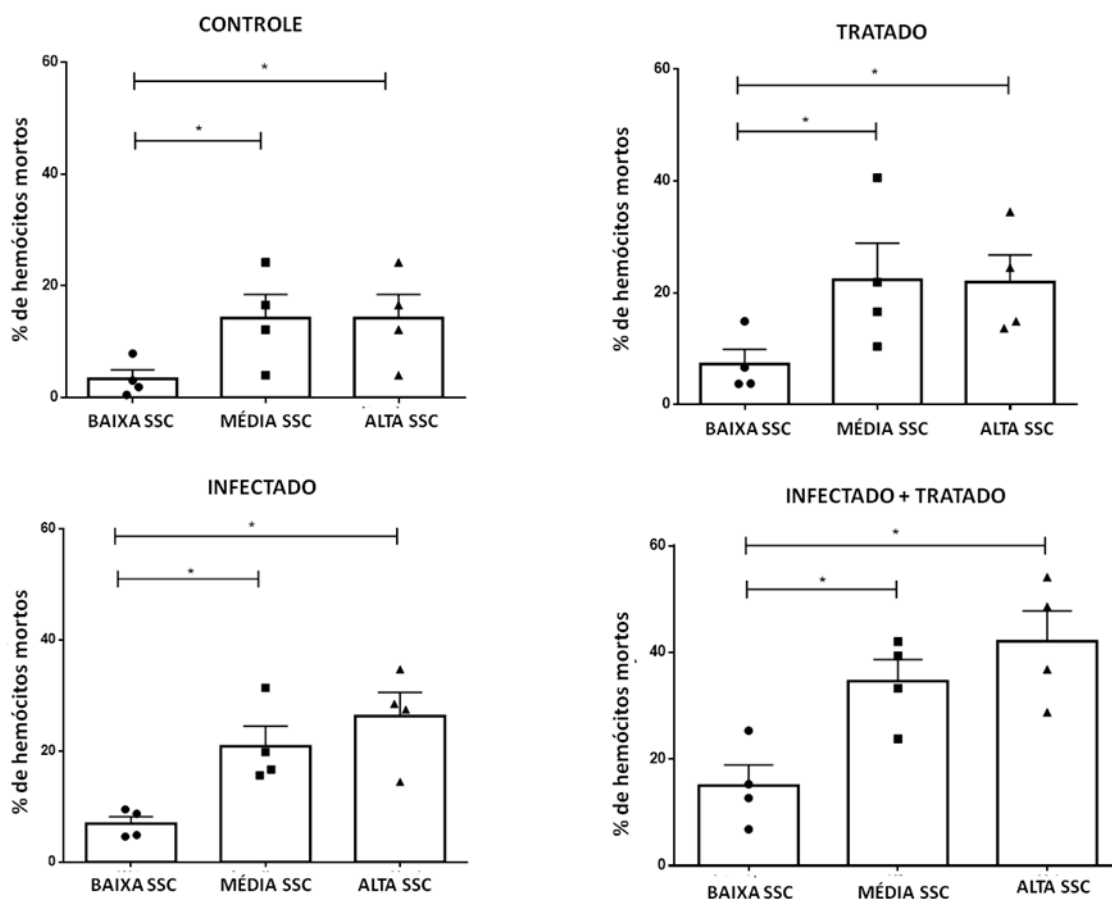


10C). Além disso, observamos maiores porcentagens de hemócitos mortos no grupo I + T quando comparados ao grupo I em subpopulações média SSC e alta SSC (média SSC,  $p = 0,028$   $U = 1$ ; alta SSC,  $p = 0,028$   $U = 1$ ) (Figura 10B e 10C). Ainda, comparando os grupos T e I + T observamos diferenças significativas em % de células mortas somente em subpopulações de hemócitos alta SSC ( $p = 0,028$   $U = 1$ ).



**Figura 10:** Análise de citometria de fluxo de três subpopulações de células - (A) Baixa, (B) Média e (C) Alta SSC. Cada barra representa as porcentagens (%) de hemócitos marcados com PI nos quatro grupos experimentais: Controle (C); Tratado (T); Infectado (I); Infectado e Tratado (I + T). Os dados estão representados como média  $\pm$  erro padrão das subpopulações de hemócitos. Houve diferenças nas porcentagens de hemócitos entre os grupos estudados (teste não paramétrico de Mann-Whitney). \*  $p < 0,05$

Em outra abordagem para análise, comparamos a viabilidade celular entre subpopulações de hemócitos dentro de cada grupo experimental. Observou-se que as subpopulações média SSC e alta SSC foram as que apresentaram maior percentual de células mortas em relação a subpopulação baixa SSC, em todos os grupos estudados (média SSC vs. baixa SSC: C  $p = 0,028$   $U = 1$ ; T  $p = 0,028$   $U = 1$ ; I + T  $p = 0,028$   $U = 1$ ) (alta SSC vs. baixa SSC: C  $p = 0,028$   $U = 1$ ; T  $p = 0,043$   $U = 1,5$ ; I + T  $p = 0,014$   $U = 0$ ). É importante notar que não observamos diferenças significativas entre a média SSC e a alta SSC em todos os grupos avaliados (Figura 11).



**Figura 11:** Análise de citometria de fluxo de quatro grupos experimentais - Controle (C); Tratado (T); Infectado (I); Infectado e Tratado (I + T). Cada barra representa as percentagens (%) de hemócitos marcados com PI nas três subpopulações celulares: Baixa, Média e Alta. Os dados estão representados como média  $\pm$  erro padrão das subpopulações de hemócitos em cada grupo experimental. Houve diferenças nas percentagens de hemócitos entre as subpopulações celulares estudadas (teste não paramétrico de Mann-Whitney). \*  $p < 0,05$

#### 4. DISCUSSÃO

As respostas dos hemócitos dos moluscos à infecções por trematódeos mostram relevante função dessas células pois desempenham um papel crucial na proteção do molusco na interação com patógenos e parasitos (Noda & Loker, 1989a; Noda & Loker, 1989b; Coustau et al., 2015). Particular atenção tem sido direcionada às alterações imunológicas induzidas pela poluição ambiental em invertebrados aquáticos, uma vez que esses compostos podem interferir na função de proteção de seu SID (Livingstone, 2000; Mohamed, 2011). As respostas de defesa de *B. glabrata* envolvem lectinas presentes na hemolinfa, que apresentam variabilidade através de diferentes processos, incluindo diversificações somáticas (Loker et al., 2010). No presente trabalho, verificamos que os hemócitos de *B. glabrata* poderiam ser classificados de acordo com a granularidade e forma celular em três subpopulações celulares, denominadas células blásticas, hialinócitos e granulócitos, em concordância com estudos prévios (Martins-Souza et al., 2006; Cavalcanti et al., 2012).

As infecções com trematódeos echinostomatídeos podem potencializar ou suprimir o SID do molusco, dependendo das condições de exposição (Lie, 1982). A competência fagocitária dos hemócitos de *B. glabrata* pode estar alterada em moluscos que passam a suportar infecções viáveis, um fenômeno chamado interferência, e correlacionada com os efeitos de produtos de excreção-secreção (PES) derivados dos estádios larvais desse parasito (Lie, 1982; DeGaffé & Loker, 1998; Coustau et al., 2015). Os fatores humorais presentes na hemolinfa de moluscos podem atuar em sinergia com os hemócitos, existindo também outros componentes envolvidos nos processos relacionados a resistência à infecção por echinostomatídeos (Ataev & Coustau, 1999; Coustau et al., 2015). Estudos prévios têm elucidado a memória imune inata adquirida em moluscos da espécie *B. glabrata*, protegendo contra uma infecção secundária por trematódeos homólogos. Ficou evidenciado que essa proteção é dependente do tempo e do genótipo e não está associada a uma melhora da resposta imune celular, mas sim que os parasitos de um desafio secundário não se desenvolvem em esporocistos sendo mortos pelo hospedeiro, sem qualquer resposta imune celular observável ou reação hemocítica, demonstrando o importante papel da resposta imune humoral em *B. glabrata* (Portela et al., 2013; Pinaud et al., 2016).

Além disso, estudos proteômicos mostraram a existência de diferentes proteínas plasmáticas expressas na glândula de albumen e secretadas na hemolinfa, tanto nas cepas suscetíveis quanto nas resistentes de *B. glabrata* à infecção por estes echinostomatídeos (Vergote et al., 2005; Coustau et al., 2015). Embora estas proteínas sejam mais abundantes em moluscos suscetíveis, mostraram-se aumentadas na linhagem resistente enquanto permaneceram estáveis nas suscetíveis, sugerindo sua relação com a regulação diferencial de genes da glândula de albumen entre estes moluscos, resultando em resistência à infecção (Vergote et al., 2005; Coustau et al., 2015).

Em nosso trabalho, observou-se que a infecção por *E. paraensei* produziu uma diminuição no número absoluto de hemócitos de *B. glabrata* com baixo percentual de células inviáveis, embora se saiba que a porcentagem de células viáveis encontradas possa ter capacidade fagocitária reduzida a frente à infecção por equinostomas (Lie & Heyneman, 1976, Noda & Loker, 1989a, Noda & Loker, 1989b, DeGaffé & Loker, 1998), enquanto o grupo I+T apresentou alta porcentagem de células inviáveis. A diminuição na contagem absoluta desses hemócitos, observada para o grupo infectado por *E. paraensei*, pode estar relacionada ao período de infecção (40 dias pós-infecção), no qual o estágio larval de rédia ocorre no complexo gônada-glândula digestiva, levando ao dano tecidual, com possível redirecionamento de hemócitos circulantes para este local (Tunholi et al., 2013; Pinheiro et al., 2004b).

Em estudos anteriores, após a exposição de moluscos do gênero *Biomphalaria* e *Lymnaea* a herbicidas, como a atrazina ou o glifosato, observou-se um aumento no número total de hemócitos (Mohamed, 2011; Russo et al., 2000). Entretanto, quando os moluscos estavam previamente parasitados, constataram atividade fagocítica reduzida, sugerindo que a associação dessas duas condições de perturbação (infecção e adicionalmente exposição ao herbicida) pode interferir fortemente em seu sistema imunológico. O aumento do número total de células na hemolinfa é esperado em moluscos submetidos a diferentes agentes perturbadores (Russo & Lagadic, 2000; Russo & Lagadic, 2004; Mohamed, 2011). É importante notar que a presença de diferentes estímulos pode levar a comportamentos específicos dos hemócitos em diferentes espécies e gêneros de moluscos, conforme observado por Seta et al. (1996) trabalhando com *B. glabrata* e *Biomphalaria*

*tenagophila* Orbigny, 1835 infectados por *S. mansoni*, no qual *B. glabrata* apresentou comportamento imune celular e reação tecidual correspondente a uma menor resistência à infecção do que a observada para *B. tenagophila*.

Em estudo anterior o efeito do herbicida Roundup<sup>®</sup> sobre a contagem diferencial de hemócitos de moluscos *Biomphalaria alexandrina*, infectados ou não por *S. mansoni*, determinou o aumento de células granulocíticas (granulócitos) denominadas hemócitos "espalhados" considerada o tipo de célula dominante, mais responsiva e altamente fagocítica em todos os grupos, apresentando maior quantidade no grupo infectado, após 24 h de exposição (Mohamed, 2011). Em contrapartida, nosso estudo mostrou um pequeno número de granulócitos em todos os grupos experimentais, sendo os hialinócitos o tipo celular mais encontrado, particularmente no grupo I+T, após 24 h de exposição. Além disso, essas diferenças podem estar relacionadas a diferentes cepas de moluscos (suscetíveis ou não suscetíveis) aos parasitos utilizados nos dois estudos (Seta et al., 1996).

Os hialinócitos são o tipo de célula com maior capacidade de emitir filópodes e maior capacidade de adesão em *B. glabrata*, desempenhando atividades imunológicas relevantes (Cavalvanti et al., 2012). Embora os hialinócitos que emitem filópodes sejam os que apresentam maior capacidade fagocitária, no presente estudo não foram observadas projeções citoplasmáticas, sugerindo uma possível influência das larvas de *E. paraensei* no comportamento dessas células, limitando seu papel na defesa do molusco (Adema et al., 1994). Além disso, nosso estudo mostrou um maior número de hialinócitos (células fagocíticas) no grupo I+T, comparado com o grupo I, evidenciando que a infecção por *E. paraensei* suprime o sistema imunológico do molusco e a associação de infecção com a exposição ao herbicida promove a proliferação desses hemócitos, embora tenha se observado elevação da mortalidade dessas células.

A variabilidade nos números e proporções relativas de hemócitos em moluscos poderia estar relacionada a diferentes fatores como condição metabólica (incluindo infecção parasitária) e até mesmo diferenças individuais (Ashton-Alcox e Ford, 1998). Por meio da técnica de citometria de fluxo, estudos elucidaram as características celulares dos hemócitos de moluscos, como a análise morfométrica e a viabilidade celular, expostos ou não a contaminantes ambientais (Russo & Lagadic, 2000; Russo & Lagadic, 2004; Martins-Souza et al., 2009; Mohamed, 2011). Aqui, utilizando esta ferramenta, foi possível observar que a porcentagem de

morte celular na subpopulação de célula com atividade fagocitária no grupo I foi menor do que a observada no grupo I+T, corroborando o fato de que a presença de infecção e toxicidade causa comprometimento molecular podendo interagir diretamente com componentes moleculares das células, induzindo necrose ou apoptose, o que provavelmente ocorreu nos grupos estudados (Fagotti et al., 1996; Russo et al., 2007; Russo et al., 2009; Mohamed, 2011).

Poucos estudos sobre o efeito de agrotóxicos em helmintos e na interação parasito-hospedeiro foram realizados até o momento, enfocando principalmente em outros organismos (Rohr et al., 2008a; Raffel et al., 2009; Monte & Maldonado, 2017). Estudos anteriores mostraram os efeitos do Roundup® Original em estádios larvais de vida livre de *E. paraensei* (miracídio e cercária) sugerindo uma possível influência no ciclo de vida deste parasito em condições naturais (Monte et al., 2016). Alterações morfológicas após a exposição a este herbicida também foram elucidadas, uma vez que este helminto é um parasito intestinal do roedor silvestre semi-aquático, *N. squamipes* e, portanto, está predisposto à exposição a agrotóxicos agrícolas (Monte et al., 2018). Nossos achados, além de mostrar que a infecção por si só causa diminuição dos hemócitos circulantes, indicou que a associação entre infecção e exposição ao herbicida aumentou muito a porcentagem de células não viáveis, sugerindo que essa condição também prejudica o SID de *B. glabrata* tornando-os mais vulneráveis a infecções parasitárias. Isso sugere que a relação parasito-hospedeiro intermediário pode ser alterada, favorecendo inclusive a dinâmica de transmissão do parasito causada pelo estresse do herbicida.

## 4. Conclusões Gerais

- A exposição ao herbicida Roundup® Original, em condições experimentais, levou a mortalidade e comprometimento de processos biológicos em todos os estádios de desenvolvimento do trematódeo *E. paraensei* (ovo, miracídio, cercária, metacercária, larva recém desencistada, helminto jovem e adulto).
- Alterações morfológicas nas larvas recém desencistadas, helminto jovem e adulto foram promovidas pela exposição ao herbicida Roundup® Original, em condições experimentais, causando modificações tegumentares e ultraestruturais.
- A infecção de *B. glabrata* por *E. paraensei* causou redução do número de hemócitos circulantes, e a associação entre infecção e exposição ao herbicida Roundup® Original, em condições experimentais, aumentou a porcentagem de morte celular, indicando um maior comprometimento do sistema interno de defesa de *B. glabrata*.
- Os hialinócitos foram o tipo celular mais abundante encontrado em *B. glabrata* em todos os grupos experimentais, apresentando diferenças significativas entre estes.
- O presente estudo evidenciou efeitos danosos ao trematódeo *E. paraensei* e ao SID de seu hospedeiro intermediário, *B. glabrata*, decorrente da exposição ao herbicida Roundup® Original em condições experimentais, e neste último caso, sugerindo o favorecimento da dinâmica de transmissão do parasito causado pelo estresse do herbicida.

## 5. Referências Bibliográficas

1. Abdel-Ghaffar F, Ahmed AK, Bakry FA, Rabei I, Ibrahim A. The impact of three herbicides on biological and histological aspects of *Biomphalaria alexandrina*, intermediate host of *Schistosoma mansoni*. **Malacologia** 2016; 59(2): 197-210.
2. Acquavella JF, Alexander BH, Mandel JS, Gustin C, Baker B, Chapman P, Bleeke M. Glyphosate biomonitoring for farmers and their families: results from the Farm Family Exposure Study. **Environ Health Perspect** 2004; 112, 321-326.
3. Adam A, Marzuki A, Abdul RH, Abdul AM. The oral and intratracheal toxicities of Roundup® and its components to rats. **Vet Hum Toxicol** 1997; 39(3): 147-151.
4. Adema CM, Arguello II DF, Stricker SA, Loker ES. A time-lapse study of interactions between *Echinostoma paraensei* intramolluscan larval stages and adherent hemocytes from *Biomphalaria glabrata* and *Helix aspersa*. **J Parasitol** 1994; 80: 719-727.
5. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Nota técnica. Reavaliação toxicológica do ingrediente ativo parationa metílica. ANVISA; 2012a.
6. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Nota técnica. Reavaliação toxicológica do ingrediente ativo forato. ANVISA; 2012b.
7. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 10 de 22 de fevereiro de 2008. Que estabelece a reavaliação toxicológica de 14 agrotóxicos. Brasília: ANVISA; DOU de 28/02/2008.
8. Agência Nacional de Vigilância Sanitária; UFPR, 2012. Seminário de mercado de agrotóxico e regulação. Brasília: ANVISA. Acesso em: 11 de Abril de 2012.



9. Aktar MW, Sengupta D, Chowdhury A. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. **Interdisc Toxicol** 2009; 2(1):1-12.
10. Alkahen HF. Effects of lethal and sublethal concentrations of lindane on the behavior and energy reserves of the freshwater fish, *Oreochromis niloticus*. **J King Saud Univ** 1996; 8:153-164.
11. Alves SB, Moraes SA. Quantificação de inóculo de patógenos de insetos. In: Alves SB. Controle Microbiano de Insetos. ESALQ / USP, Piracicaba, São Paulo: FEALQ. 1998. pp. 1163.
12. Amarante Júnior OP, Santos TCR, Brito NM. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Quim Nova** 2002; 25, 589-593.
13. Ashton-Alcox KA, Ford SE. Variability in molluscan hemocytes: a flow cytometric study. **Tissue Cell** 1998; 30: 195-204.
14. Associação Brasileira de Saúde Coletiva - ABRASCO. Associação Brasileira de Agroecologia - ABA. Dossiê Científico e Técnico contra o Projeto de Lei do Veneno (PL 6.229/2002) e a favor do Projeto de Lei que institui a Política Nacional de Redução de Agrotóxicos - PNARA. Rio de Janeiro (RJ); 2018. 183p.
15. Associação Brasileira de Saúde Coletiva. Dossiê ABRASCO - Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Parte 1 - Agrotóxicos, segurança alimentar e nutricional e saúde. 2012. 88p.
16. Ataev GL, Coustau C. Cellular response to *Echinostoma caproni* infection in *Biomphalaria glabrata* strains selected for susceptibility/resistance. **Dev Comp Immunol** 1999; 23: 187-198.
17. Augusto RC, Tetreau G, Chan P, Walet-Balieu ML, Mello-Silva CC, Santos CP, Grunau C. Double impact: natural molluscicide for schistosomiasis vector control also impedes *Schistosoma mansoni* cercariae

into adult parasites. **PLoS Negl Trop Dis** 2017; 11(7): e0005789 doi: 10.1371/journal.pntd.0005789.

18. Bakry FA, Ismail SM, Abd El-Atti MS. Glyphosate herbicide induces genotoxic effect and physiological disturbances in *Bulinus truncatus* snails. **Pestic Biochem Physiol** 2015; 123: 24-30.

19. Barracco MA, Steil AA, Gargioni R.. Morphological characterization of the hemocytes of the pulmonate snail *Biomphalaria tenagophila*. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1993; 88: 73–83.

20. Benachour N, Séralini GE. Glyphosate formulations induce apoptosis and necrosis in human umbilical, embryonic and placental cells. **Chem Res Toxicol** 2009; 22: 97-105.

21. Benachour N, Sipahutar H, Moslemi S, Gasnier C, Travert C, Séralini GE. Time- and dose- dependent effects of Roundup® on human embryonic and placental cells. **Arch Environ Contam Toxicol** 2007; 53: 126-133.

22. Benedetti AL, Vituri CL, Trentin AG, Domingues MAC, Alvarez-Silva M. The effects of sub-chronic exposure of Wistar rats to the herbicide Glyphosate-Biocarb. **Toxicol Lett** 2004; 153(2):227-232.

23. Bennett SC, Irwin SWB, Fitzpatrick SM. Tributyltin and copper effects on encystment and *in vitro* excystment of *Parorchis acanthus* larvae. **J Helminthol** 2003; 77: 291-296.

24. Bezerra FSM, Nogueira-Machado JA, Chaves MM, Martins RL, Coelho PMZ. Quantification of the number and phagocytary activity of hemocytes of resistant and susceptible strains of *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria tenagophila* infected with *Schistosoma mansoni*. **Rev Inst Med Trop São Paulo** 1997; 39(4):197-201.

25. Bolker B, Holyoak M, Krivan V, Rowe L, Schmitz O. Connecting theoretical and empirical studies of trait-mediated interactions. **Ecology** 2003; 84:1101–1114.
26. Bombardi LM. A intoxicação por agrotóxicos no Brasil e a violação dos direitos humanos. In: Merlino T, Mendonça ML. (Org.). Direitos humanos no Brasil 2011: Relatório. São Paulo: Rede Social de Justiça e Direitos Humanos. 2011. p.71-82.
27. Bonieka B, Guttowa A. The influence of pesticides on the oxygen uptake by miracidia of *Fasciola hepatica* (Trematoda). **Bull Acad Pol Sci Biol** 1975; 23:463-467.
28. Bonvicino CR, Oliveira JA, D`andrea PS. *Guia dos roedores do Brasil, com chaves para gêneros baseados em caracteres externos*. Rio de Janeiro: Centro Pan Americano de Febre Aftosa – OPAS/OMS, 2008. 120 p.
29. Bradley CA, Altizer S. Urbanization and the ecology of the wildlife diseases. **Trends Ecol Evol** 2007; 22: 95-102.
30. Brázová T, Hanzelová V, Miklisová D, Salamun P, Vidal-Martínez VM. Host-parasite relationship as determinants of heavy metal concentration in perch (*Perca fluviatilis*) and its intestinal parasite infection. **Ecotoxicol Environ Saf** 2015; 122: 551-556.
31. Brglez J, Wikehauser T. On the effect of some fertilizers and copper sulphate upon the survival of cercariae and metacercariae of *Fasciola hepatica*. **Wiad Parazytol** 1968; 14: 675-677.
32. Bricker CS, Depenbusch JW, Bennett JL. Effects of Praziquantel. **Am J Trop Med Hyg** 1982; 72:132-142.
33. Brock TCM, Larh J, Van den Brink PJ. Ecological risks of pesticides in freshwater ecosystems Part 1: Herbicides Alterra-Rapport 088 (Alterra, Green World Research). 2000.

34. Caputo LFG, Gitirana LB, Manso PPA. Técnicas histológicas. In: Molinaro EM, Caputo LFG, Amendoeira MRR. Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde. Vol. 2. Rio de Janeiro: Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio. 2010. p. 290.
35. Carboni RZ, Mazzonetto F. Efeito do extrato aquoso de diferentes espécies vegetais no manejo de *Meloidogyne incognita* em tomateiro em ambiente protegido. **Revista Agrogeoambiental**. 2013; 5: 61-66.
36. Carneiro FF, Pignati W, Rigotto RM, Augusto LGM, Rizzolo A, Faria NMX, Alexandre VP, Friedrich K, Mello MSC. Dossiê ABRASCO – Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Parte 1 – Agrotóxicos, Segurança Alimentar e Nutricional e Saúde. Rio de Janeiro. 2012. p. 88.
37. Carvalho OS, Jannotti-Passos LK, Caldeira RL. Importância epidemiológica e biologia molecular aplicada ao estudo dos moluscos do gênero *Biomphalaria*. In: OS Carvalho, PMZ Coelho, HL Lenzi. *Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar*. Fiocruz, Rio de Janeiro. 2008. p. 311-345.
38. Cattani D, de Liz Oliveira Cavalli VL, Heinz Rieg CE, Domingues JT, Dal-Cim T, Tasca CI, Mena Barreto Silva FR, Zamoner A. Mechanisms underlying the neurotoxicity induced by glyphosate-based herbicide in immature rats hippocampus: involvement of glutamate excitotoxicity. **Toxicology** 2014; 320, 34-45.
39. Cavalcanti MGS, Filho FC, Mendonça AMB, Duarte GR, Barbosa CCGS, De Castro CMMB, Alves LC, Brayner FA. Morphological characterization of hemocytes from *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria straminea*. **Micron** 2012; 43: 285-291.
40. Chai JY. Echinostomes in humans. In: Fried B, Toledo R. The biology of Echinostomes: from the molecule to the community. New York: Springer, 2009. p. 147-183.

41. Cheng X, Liu X, Wong H, Ji X, Wang K, Wei M, Qiao K. Effect of Emamectin benzoate on root-knot nematodes and tomato yield. **Plos One**. 2015; DOI:10.1371/journal.pone.0141235.
42. Chlopecka M, Mendel M, Dziekan N, Karlik W. Glyphosate affects the spontaneous motoric activity of intestine at very low doses – *in vitro* study. **Pestic Biochem Physiol** 2014; 113, 25-30.
43. Clair E, Mesnage R, Travert C, Séralini GE. A glyphosate-based herbicide induces necrosis and apoptosis in mature rat testicular cells *in vitro*, and testosterone decrease at lower levels. *Toxicology in vitro: an International Journal published in Association with BIBRA*. 2012; 26, 269-279.
44. Clavijo A, Kronberg MF, Rossen A, Moya A, Calvo D, Salatino SE, Pagano EA, Morabito JA, Munarriz ER. The nematode *Caenorhabditis elegans* as an integrated toxicological tool to assess water quality and pollution. **Sci Total Environ** 2016; 569-570:252-261.
45. Coustau C, Gourbal B, Duval D, Yoshino TP, Adema CM, Mitta G. Advances in gastropod immunity from the study of the interaction between the snail *Biomphalaria glabrata* and its parasites: A review of research progress over the last decade. **Fish Shellfish Immunol** 2015; 46: 5-16.
46. Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD. Infectious diseases and amphibian populations declines. **Divers Distrib** 2003; 9: 141-150.
47. DeGaffé G, Loker ES. Susceptibility of *Biomphalaria glabrata* infection with *Echinostoma paraensei*: correlation with the effect of parasite excretory-secretory products on host hemocyte spreading. **J Invertebr Pathol** 1998; 71: 64-72.
48. Dominguez DM, Reina M, Santos-Guerra A, Santana O, Agullo T, Lopez-Balboa C, Gonzalez-Coloma A. Pyrrolizidine alkaloids from Canarian endemic plants and their biological effects. **Biochem Sys Ecol** 2008; 36:153–166.

49. Dornelles MF, Oliveira GT. Effect of atrazine, glyphosate and quinclorac on biochemical parameters, lipid peroxidation and survival of bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*). **Arch Environ Contam Toxicol** 2014; 66:415-429.
50. Dorsey CH, Cousin CE, Lewis FA, Stirewalt MA. Ultrastructure of the *Schistosoma mansoni* cercaria. **Micron** 2002; 33: 279-323.
51. Dreyer DL, Jones KC, Molyneux RJ. Feeding deterrence of some pyrrolizidine, indolizidine, and quinolizidine alkaloids towards Pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*) and evidence for phloem transport of indolizidine alkaloid swainsonine. **J Chem Ecol** 1985; 11:1045–1051.
52. Duke SO, Powles SB. Glyphosate-resistant crops and weeds. Now and in the future. **AgBioForum**. 2009; 12(3 e 4): 346-357.
53. el-Gendy KS, Aly NM, el-Sebae AH. Effects of edifenphos and glyphosate on the immune response and protein biosynthesis of bolti fish (*Tilapia nilotica*). **J Environ Sci Health B** 1998; 33(2):135-149.
54. El-Shenawy NS. Oxidative stress responses of rats exposed to Roundup® and its active ingredient glyphosate. **Environ Toxicol Pharmacol** 2009; 28: 379-385.
55. Ernest KA, Mares MA. Ecology of *Nectomys squamipes*, the Neotropical Water rat, in central Brazil: home range, habitat selection, reproduction and behaviour. **J Zool** 1986; 210(4):599-612.
56. Esteban JG, Muñoz-Antoli C. Echinostomes: Systematics and life cycle. In: Fried B, Toledo R. The biology of echinostomes from the molecule to the community. Springer, New York. 2009, pp. 1-34.
57. Evans NA. Effects of copper and zinc on the life cycle of *Notocotylus attenuatus* (Digenea: Notocotylidae). **Int J Parasitol** 1982; 12: 363-369.

58. Fagotti A, Di Rosa I, Simoncelli F, Pipe R. The effects of copper on actin and fibronectin organization in *Mytilus galloprovincialis* haemocytes. **Dev Comp Immunol** 1996; 20: 383–391.
59. Ferraz J, Souza J, Costa-Silva M, Torres E, Santana A, Lanfredi R, et al. Effect of praziquantel on adult *Echinostoma paraensei* worms in experimentally infected mice. **Parasitol Res** 2012; 111(1):143-148.
60. Finney DJ. Probit Analysis. 3. ed. London, Cambridge University Press. 1971. p. 583.
61. Fournier M, Cyr D, Blakley B, Boermans H, Brousseau P. Phagocytosis as a biomarker of immunotoxicity in wildlife species exposed to environmental xenobiotics. **Am Zool** 2000; 40: 412–420.
62. Franzener G, Martinez-Franzener AS, Stangarlin JR, Furlanetto C, Schwan-Estrada KRF. Proteção de tomateiro a *Meloidogyne incognita* pelo extrato aquoso de *Tagetes patula*. **Nematologia Brasileira** 2007; 31: 27-36.
63. Fried B, Bennett MC. Studies on encystment of *Echinostoma revolutum* cercariae. **J Parasitol** 1979; 65: 38-40.
64. Fried B, Graczyk TK, Tamang L. Food-borne intestinal trematodiasis in humans. **Parasitol Res** 2004; 93: 159-170.
65. Fried B, Graczyk TK. Echinostomes as experimental models for biological research. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 2000.
66. Fried B, Huffman JE. The biology of the intestinal trematode *Echinostoma caproni*. **Adv Parasitol** 1996; 38: 311-368.
67. Fried B. Maintenance, cultivation, and excystation of echinostomes. In: Fried B, Graczyk TK. Echinostomes as experimental models for biological research. Netherlands. Kluwer Academic Publishers. 2000, pp. 99-114.

68. Fundação Oswaldo Cruz. Nota Técnica. Análise do Projeto de Lei nº 6.299/2002. FIOCRUZ; 2018.

69. Fürst T, Keiser J, Utzinger J. Global burden of human food-borne trematodiasis: a systematic review and meta-analysis. **Lancet Infect Dis** 2012; 12: 210-221.

70. Garcia JS, Hooper CS, Simões RO, Santos MA, Maldonado Júnior A, Pinheiro J. Biochemical and histological responses of *Rattus norvegicus* (Wistar) infected by *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae). **Vet Parasitol** 2011; 178(1-2):86-92.

71. Garcia JS, Pinheiro J, Hooper CS, Simões RO, Maldonado Júnior A. Haematological alterations in *Rattus norvegicus* (Wistar) experimentally infected with *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae). **Exp Parasitol** 2012; 131: 300-303.

72. Georgieva S, Selbach C, Faltynkova A, Soldanova M, Sures B, Skirnisson K, Kostadinova A. New cryptic species of the "revolutum" group of *Echinostoma* (Digenea: Echinostomatidae) revealed by molecular and morphological data. **Parasit Vectors** 2013; 6:64.

73. Georgieva S, Faltýnková A, Brown R, Blasco-Costa I, Soldánová M, Sitko J, Scholz T, Kostadinova A. *Echinostoma revolutum* (Digenea: Echinostomatidae) species complex revised: species delimitation based on novel molecular and morphological data gathered in Europe. **Parasit Vectors** 2014; 27:520.

74. Ghandour AM, Webbe G. The effect of sublethal concentrations of the molluscicide niclosamide on the infectivity of *Schistosoma mansoni* cercariae. **J Helminthol** 1975; 49: 245–250.

75. Giannakou IO, Sidiropoulos A, Prophetou-Athanasiadou D. Chemical alternatives to methyl bromide for the control of root-knot nematodes in greenhouses. **Pest Manag Sci** 2002; 58: 290–296.



76. Gluszczak L, dos Santos Miron D, Crestani M, Braga da Fonseca M, de Araújo Pedron F, Duarte MF, Vieira VL. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). **Ecotoxicol Environ Saf** 2006; 65(2): 237-241.
77. Gluszczak L, Miron DS, Moraes BS, Simões RR, Schetinger MRC, Morsch VM, Loro VL. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol** 2007; 146: 519-524.
78. Gonçalves JP, Oliveira-Menezes A, Maldonado Júnior A, Carvalho TMU, Souza W. Evaluation of praziquantel effects on *Echinostoma paraensei* ultrastructure. **Vet Parasitol** 2013; 194(1):16-25.
79. Graczyk TK, Fried B. Echinostomiasis: a common but forgotten food-borne disease. **Am J Trop Med Hyg** 1998; 58: 501-504.
80. Greenberg RM. Are Ca<sup>+2</sup> channels targets of praziquantel action? **Int J Parasitol** 2005; 35(1):1-9.
81. Grisolia CK. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. **Mutat Res** 2002; 518(2): 145-150.
82. Grube A, Donaldson D, Kiely T, Wu L. Pesticides industry sales and usage – 2006 and 2007 market estimates. US Environmental Protection (US EPA). 2011; p. 41.
83. Gruys KJ, Sikorski JA. Inhibitors of tryptophan, phenylalanine and tyrosine biosynthesis as herbicides. In: SINGH, BK. Plant amino acids: biochemistry and biotechnology. New York: Marcel Dekker, 1999. p. 357-384.
84. Gupta SC, Kamra DN. Influence of wastelago fermentation on viability of *Fasciola gigantica* metacercariae. **Biological Wastes** 1987; 22: 311-313.

85. Gurgel AM, Guedes CA, Gurgel IGD, Augusto LGS. Reflexos da perda do controle estatal sobre agrotóxicos no Brasil e sua regulação no mercado. **Rev Eletron Comun Inf Inov Saúde**. 2017; 11(3): 1-16.
86. Gustafson KD, Belden JB, Bolek MG. The effects of herbicide atrazine on freshwater snails. **Ecotoxicology** 2015; 24: 1183-1197.
87. Hammer O, Harper DAT, Ryan PD. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Palaeontol Electron** 2001; 4:9.
88. Hare JF, Eisner T. Pyrrolizidine alkaloid deters ant predators of *Utetheisa ornatrix* eggs: effects of alkaloid concentration, oxidation state, and prior exposure of ants to alkaloid-laden prey. **Oecologia** 1993; 96: 9–18.
89. Hock SD, Poulin R. Exposure of the snail *Potamopyrgus antipodarum* to herbicide boosts output and survival of parasite infective stages. **Int J Parasitol Parasites Wildl** 2012; 15:13-18.
90. Horvat T, Kalafatic M, Kopjar N, Kovacevic G. Toxicity testing of herbicide norflurazon on an aquatic bioindicator species - the planarian *Polycelis felina* (Daly.). **Aquat Toxicol** 2005; 73(4):342-352.
91. Huffman JE, Fried B. *Echinostoma* and Echinostomiasis. **Adv Parasitol** 1990; 29:215-269.
92. IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil – Uma abordagem ambiental. Brasília. 2010.
93. IBGE. Censo agropecuário do Brasil, 2006. Disponível em: <[www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br)> . Acesso em: 17 de maio de 2018.

94. Idris N, Fried B. Development, hatching, and infectivity of *Echinostoma caproni* (Trematoda) eggs, and histologic and histochemical observations on the miracidia. **Parasitol Res** 1996; 82:136-142.
95. International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans - volume 112: Some organophosphate insecticides and herbicides - Glyphosate. Lyon, France. 2017; p. 321-399.
96. Iummato MM, Sabatini SE, Cacciatore LC, Cochón AC, Cataldo D, Molina MCR, Juárez AB. Biochemical responses of the golden mussel *Limnoperna fortunei* under dietary glyphosate exposure. **Ecotoxicol Environ Saf** 2018; 163: 69-75.
97. Jardim ICSF, Andrade JA, Queiroz SCN. Residues of pesticides in food: a global environmental preoccupation - focussing on apples. **Quim Nova** 2009; 32: 996-1012.
98. Jasper R, Locatelli GO, Pilati C, Locatelli C. Evaluation of biochemical, hematological and oxidative parameters in mice exposed to the herbicide glyphosate-Roundup. **Interdiscip Toxicol** 2012; 5(3): 133-140.
99. Jaworski EG. Mode of action of N-phosphonomethylglycine: inhibition of aromatic amino acid biosynthesis. **J Agric Food Chem** 1972; 20: 1195-1198.
100. Jiménez FA, Gardner SL, Araujo A, et al. Zoonotic and human parasites of inhabitants of Cueva de los Muertos Chiquitos, Rio Zape Valley, Durango, Mexico. **J Parasitol** 2012; 98: 304-309.
101. Johnson PTJ, Sutherland DR. Amphibian deformities and Ribeiroia infection: an emerging helminthiasis. **Trends Parasitol** 2003; 19:332–335.
102. Jones JT, Haegeman A, Danchin EGJ, Gaur HS, Helder J, Jones MGK, Kikuchi T, Manzanilla-López R, Palomares-Rius JE, Wesemael WML, Perry RN. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. **Mol Plant Pathol** 2013; 14: 946-961.

103. Kiesecker JM. Synergism between trematode infection and pesticide exposure: a link to amphibian limb deformities in nature? **Proc Natl Acad Sci USA**. 2002; 99:9900-9904.
104. Koprivnikar J, Forbes MR, Baker RL. Contaminant effects on host-parasite interactions: Atrazine, frogs and trematodes. **Environ Toxicol Chem** 2007; 26: 2166–2170
105. Koprivnikar J, Forbes MR, Baker RL. Effects of atrazine on cercarial longevity, activity, and infectivity. **J Parasitol** 2006; 92: 306–311.
106. Koprivnikar J, Redfern JC. Agricultural effects on amphibian parasitism: importance of general habitat perturbations and parasite life cycles. **J Wildl Dis** 2012; 48: 925-936.
107. Koprivnikar J, Walker PA. Effects of the herbicide atrazine's metabolites on host snail mortality and production of trematode cercariae. **J Parasitol** 2011; 95(5): 823-827.
108. Koprivnikar J. Interactions of environmental stressors impact survival and development of parasitized larval amphibians. **Ecol Appl** 2010; 20: 2263-2272.
109. Kostadinova A, Gibson DI. The systematics of the echinostomes. In: Fried B, Graczyk JK. Echinostomes as experimental models for biological research. Kluwer, Dordrecht. 2000. pp. 31-57.
110. Kostadinova A. Review of "The biology of Echinostomes. From the molecule to the community" by Bernard Fried and Rafael Toledo (eds.). **Parasit Vectors** 2009; 2:52.
111. Kristoff G, Cacciatore LC, Verrengia Guerrero NRV, Cochón AC. Effects of the organophosphate insecticide azinphos-methyl on the reproduction and cholinesterase activity of *Biomphalaria glabrata*. **Chemosphere** 2011; 84: 585-591.
112. Kristoff G, Verrengia Guerrero NRV, Cochón AC. Inhibition of cholinesterases and carboxylesterases of two invertebrate species, *Biomphalaria glabrata* and *Lumbriculus variegatus*, by the carbamate pesticide carbaryl. **Aquat Toxicol** 2010; 96: 115-123.

113. Kuntz RE, Stirewalt MA. Effects of DDT on cercariae of *Schistosoma mansoni*. **J Parasitol** 1946; 32: 529–538.
114. Lafferty KD, Kuris AM. How environmental stress affects the impacts of parasites. **Limnol Oceanogr** 1999; 44:925-931.
115. Lanctôt C, Navarro-Martin L, Robertson C, Park B, Jackman P, Pauli BD, et al. Effects of glyphosate-based herbicides on survival, development, growth and sex ratios of wood frog (*Lithobates sylvaticus*) tadpoles. II: Agriculturally relevant exposures to Roundup® WeatherMax and Vision under laboratory conditions. **Aquat Toxicol** 2014; 154:291-303.
116. Langiano VC, Martinez CBR. Toxicity and effects of glyphosate-based herbicide on Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol** 2008; 147(2):222-231.
117. Larsen KE, Lifschitz AL, Lanusse CE, Virkel GL. The herbicide glyphosate is a weak inhibitor of acetylcholinesterase in rats. **Environ Toxicol Pharmacol** 2016; 45: 41-44.
118. Lehrer EW, Fredebaugh SL, Schooley RL, Mateus-Pinilla NE. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in woodchucks across an urban-rural gradient. **J Wildl Dis** 2010; 46: 977-980.
119. Leles D, Cascardo P, Freire Ados S, et al. Insights about echinostomiasis by paleomolecular diagnosis. **Parasitol Int** 2014; 63: 646-649.
120. Leng ML, Leovey EMK, Zubkoff PL. Agrochemical environmental fate: state of art. 1st ed. Lewis Publishers. USA. 1995.
121. Lie KJ, Basch PF. The life history of *Echinostoma paraensei* sp. n. (Trematoda:Echinostomatidae). **J Parasitol** 1967; 53:1192-1199.
122. Lie KJ, Heyneman D. Studies on resistance in snails. 6. Escape of *Echinostoma lindoense* sporocysts from encapsulation in the snail heart and subsequent loss of the host's ability to resist infection by the same parasite. **J Parasitol** 1976; 62: 298-302.

123. Lie KJ, Jeong KH, Heyneman D. Molluscan host reactions to helminthic infections. In: Immune responses in parasitic infections (E.J.L. Soulsby, Ed.). Press, Boca Raton, Florida. 1987. pp. 211-270.
124. Lie KJ. Studies on Echinostomatidae (Trematoda) in Malaya. IX. The Mehlis gland complex in echinostomes. **J Parasitol** 1965; 51: 789-792.
125. Lie KJ. Survival of *Schistosoma mansoni* and other trematode larvae in the snail *Biomphalaria glabrata*. A discussion of the interference hypothesis. **Trop Geogr Med** 1982; 34: 111-122.
126. Lima MG, Augusto RC, Vasconcellos MC, Mello-Silva CC, Pinheiro J. Metabolic changes in *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni* exposed to latex of *Euphorbia milli* solution versus time preparation. **J Nat Prod** 2012; 5: 222-232.
127. Livingstone DR, Chipman JK, Lowe DM, Minier C, Mitchelmore CL, Moore MN, Peters LD, Pipe RK. Development of biomarkers to detect the effects of organic pollution on aquatic invertebrates: recent molecular, genotoxic, cellular and immunological studies on the common mussel (*Mytilus edulis* L.) and other mytilids. **Int J Environ Pollut** 2000; 13: 56–91.
128. Lo Verde PT, Gherson J, Richards CS. Amebocytic accumulations in *Biomphalaria glabrata*: fine structure. **Dev Comp Immunol** 1982; 6: 441 -449.
129. Lockyer AE, Spinks J, Noble LR, Rollinson D, Jones CS. Identification of genes involved in interactions between *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni* by suppression subtractive hybridization. **Mol Biochem Parasitol** 2007; 151: 18-27.
130. Loker ES, Bayne CJ, Yui MA. Echinostoma *paraensei*: Hemocytes of *Biomphalaria glabrata* as targets of echinostome mediated interference with host snail resistance to *Schistosoma mansoni*. **Exp Parasitol** 1986; 62: 149-154.

131. Loker ES, Adema CM. Schistosomes, Echinostomes and Snails: Comparative Immunobiology. **Parasitol Today** 1995; 11(3): 120-123.
132. Loker ES, Hertel LA. Alterations in *Biomphalaria glabrata* plasma induced by infection with digenetic trematode *Echinostoma paraensei*. **J Parasitol** 1987; 73: 503-513.
133. Loker ES. Gastropod immunobiology. In: Soderhall K. Invertebrate immunity. New York: Springer-Verlag New York Inc. 2010. p. 17-43.
134. Lushchark OV, Kubrak OI, Storey JM, Storey KB, Lushchark VI. Low toxic herbicide Roundup® induces mild oxidative stress in goldfish tissues. **Chemosphere** 2009; 76: 932-937.
135. Maldonado Júnior A, Lanfredi RM. Echinostomes in the wild. In: Toledo R, Fried B. The biology of echinostomes from the molecule to the community., New York: Springer. 2009. pp.129-145.
136. Maldonado Júnior A, Loker ES, Morgan JA, Rey L, Lanfredi RM. Description of the adult worms of a new brazilian isolate of *Echinostoma paraensei* (Platyhelminthes:Digenea) from its natural vertebrate host *Nectomys squamipes* by light and scanning electron microscopy and molecular analysis. **Parasitol Res** 2001a; 87(10):840-848.
137. Maldonado Júnior A, Vieira GO, Garcia JS, Rey L, Lanfredi RM. Biological aspects of a new isolate of *Echinostoma paraensei* (Trematoda:Echinostomatidae): susceptibility of sympatric snails and the natural vertebrate host. **Parasitol Res** 2001b; 87: 853-859.
138. Maldonado Júnior A, Zeitone BK, Amado LA, Rosa IF, Machado-Silva JR, Lanfredi RM. Biological variation between two brazilian geographical isolates of *Echinostoma paraensei*. **J Helminthol** 2005; 79:345-51.

139. Marc J, Mulner-Lorillon O, Boulben S, Hureau D, Durand G, Bellé R. Pesticide RoundUp provokes cell division dysfunction at the level of CDK1/cyclin B activation. **Chem Res Toxicol** 2002; 15: 326-331.
140. Martins MCB, Santos CDG. Ação de extratos de plantas medicinais sobre juvenis de *Meloidogyne incognita* raça 2. **Revista Ciência Agronômica** 2016; 47:135-142.
141. Martins-Souza RL, Pereira CA, Coelho PMZ, Martins Filho OA, Negrão-Côrrea D. Flow cytometry analysis of the circulating haemocytes from *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria tenagophila* following *Schistosoma mansoni* infection. **Parasitology** 2009; 136: 67–76.
142. Martins-Souza RL, Pereira CA, Martins Filho OA, Coelho PMZ, Correa Jr A, Negrão-Correa D. Differential lectin labeling of circulating hemocytes from *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria tenagophila* resistant or susceptible to *Schistosoma mansoni* infection. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 2006; 101: 185–192.
143. Matos FA, Sant Anna V, Maldonado Júnior A, Pinheiro J. Morphology of *Echinostoma paraensei* Lie & Basch, 1967 (Trematoda) cercariae. **Braz J Biol** 2018; 78(2): 391-393.
144. Matricon-Gondran M, Letocart M. Internal defenses of the snail *Biomphalaria glabrata* I. Characterization of hemocytes and fixed phagocytosis. **J Invertebr Pathol** 1999; 74: 224–234.
145. Mattocks AR. Toxicity of pyrrolizidine alkaloids. **Nature** 1968; 217: 723–728.
146. Mcgrew AK, O'hara TM, Stricker CA, Castellini JM, Beckmen KB, Salman MD, et al. Ecotoxicoparasitology: Understanding mercury concentrations in gut contents, intestinal helminths and host tissues of Alaskan gray wolves (*Canis lupus*). **Sci Total Environ** 2015; 536:866-871.
147. McVey KA, Snapp IB, Johnson MB, Negga R, Pressley AS, Fitsanakis VA. Exposure of *C. elegans* eggs to a glyphosate-containing



herbicide leads to abnormal neuronal morphology. **Neurotoxicol Teratol** 2016; 55:23-31.

148. Mehlhorn H, Kojima S, Rim HJ, Ruenwongsa P, Andrews P, Thomas H, et al. Ultrastructural investigations on the effects of praziquantel on human trematodes from Asia: *Clonorchis sinensis*, *Metagonimus yokogawai*, *Opisthorchis viverrini*, *Paragonimus westermani* and *Schistosoma japonicum*. **Arzneimittelforschung** 1983; 33(1):91-98.

149. Mello-Silva CC, Vilar MM, Bezerra JCB, Vasconcellos MC, Pinheiro J, Rodrigues MLA. Reproductive activity alterations on the *Biomphalaria glabrata* exposed to *Euphorbia splendens* var. *hislopii* latex. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 2007; 102(6): 671-674.

150. Mello-Silva CC, Vilar MM, Vasconcellos MC, Pinheiro J, Rodrigues MLA. Carbohydrate metabolism alterations in *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni* and exposed to *Euphorbia splendens* var. *hislopii* latex. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 2010; 105(4): 492-495.

151. Mesnage R, Bernay B, Séralini G, -E. Ethoxylated adjuvants of glyphosate-based herbicides are active principles of human cell toxicity. **Toxicology** 2013; 313: 122-128.

152. Moczon T. Influence of pesticides on the activities of some oxidoreductases in the miracidia of *Fasciola hepatica*. Histochemical data. **Bull Acad Pol Sci Biol** 1976a; 24: 227-231.

153. Moczon, T. Inhibitory effect of pesticides on phosphatase, glucosidase and acetylcholinesterase activity in miracidia of *Fasciola hepatica*. Histochemical data. **Bull Acad Pol Sci Biol** 1976b; 24: 289-292.

154. Mohamed AH. Sublethal toxicity of Roundup to immunological and molecular aspects of *Biomphalaria alexandrina* to *Schistosoma mansoni* infection. **Ecotoxicol Environ Saf** 2011; 74: 754-760.

155. Monte TCC, Braga BV, Vasconcellos MC, Jurberg AD, Mota EM, Barbosa HS, Garcia JS, Maldonado Júnior A. Morphological effects on helminth parasites caused by herbicide under experimental conditions. **Braz J Vet Parasitol** 2018; 27: 41-50.
156. Monte TCC, Garcia J, Gentile R, Vasconcellos MC, Souza J, Braga BV, Maldonado AJ. *In vivo* and *in vitro* effects of the herbicide Roundup® on developmental stages of the trematode *Echinostoma paraensei*. **Exp Parasitol** 2016; 169:43-50.
157. Monte TCC, Maldonado Júnior A. What do we know about the effects of pesticides on helminths? **JSM Biol** 2017; 2(1):1008.
158. Morley NJ, Crane M, Lewis JW. Toxicity of cadmium and zinc mixtures to cercarial tail loss in *Diplostomum spathaceum* (Trematoda: Diplostomidae). **Ecotoxicol Environ Saf** 2005; 60: 53-60.
159. Morley NJ, Crane M, Lewis JW. Toxicity of cadmium and zinc to cercarial tail loss in *Diplostomum spathaceum* (Trematoda: Diplostomidae). **Parasitology** 2002; 125 (Pt 3): 293-301.
160. Morley NJ, Crane M, Lewis JW. Toxicity of cadmium and zinc to *Diplostomum spathaceum* (Trematoda: Diplostomidae) cercarial survival. **Int J Parasitol** 2001; 31: 1211–1217
161. Morley NJ, Crane M, Lewis JW. Toxicity of cadmium and zinc to encystment and *in vitro* excystment of *Parorchis acanthus* (Digenea: Philophthalmidae). **Parasitology** 2001; 122: 75-79.
162. Morley NJ, Irwin SWB, Lewis JW. Pollution toxicity to the transmission of larval digeneans through their molluscan hosts. **Parasitology** 2003; 126: S5-S26.
163. Moyes CD, Schulte PM. *Princípios de fisiologia animal*. Porto Alegre, Artmed: 2010. p.526-571.

164. Narberhaus I, Zintgraf V, Dobler S. Pyrrolizidine alkaloids on three trophic levels – evidence for toxic and deterrent effects on phytophages and predators. **Chemoecology** 2005; 15:121–125.
165. Navarro-Martin L, Lanctot C, Jackman P, Park BJ, Doe K, Pauli BD, Trudeau VL. Effects of glyphosate-based herbicides on survival, development, growth and sex ratios of wood frog (*Lithobates sylvaticus*) tadpoles. I: Chronic laboratory exposures to VisionMax. **Aquat Toxicol** 2014;154: 278-90.
166. Negga R, Rudd DA, Davis NS, Justice AN, Hatfield HE, Valente AL, Fields AS, Fitsanakis VA. Exposure to Mn/Zn ethylene-bis-dithiocarbamate and glyphosate pesticides leads to neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans*. **Neurotoxicology** 2011; 32:331–341.
167. Negga R, Stuart JA, Machen ML, Salva J, Lizek AJ, Richardson SJ, Osborne AS, Mirallas O, McVey KA, Fitsanakis VA. Exposure to glyphosate- and/or Mn/ Zn-ethylene-bis-dithiocarbamate-containing pesticides leads to degeneration of gamma-aminobutyric acid and dopamine neurons in *Caenorhabditis elegans*. **Neurotox Res** 2012; 21:281–290.
168. Negrão-Corrêa D, Pereira CAJ, Rosa FM, Martins-Souza RL, Andrade ZA, Coelho PMZ. Molluscan response to parasite: *Biomphalaria* and *Schistosoma mansoni* interaction. **Invertebrate Survival Journal** 2007; 4: 101-111.
169. Nicol JM, Turner SJ, Coyne DL, den Nijs L, Hockland S, Maafi ZT. Current nematode threats to world agriculture. In: Jones JT, Gheysen G, Fenoll C, editors. Genomics and Molecular Genetics of Plant–Nematode Interactions. Heidelberg: Springer. 2011; p. 21–44
170. Noda S, Loker ES. Effects of infection with *Echinostoma paraensei* on the circulating haemocytes population of the host snail *Biomphalaria glabrata*. **Parasitology** 1989a; 98: 1–10.
171. Noda S, Loker ES. Phagocytic activity of hemocytes of M line *Biomphalaria glabrata* snails: Effect of exposure to the trematode *Echinostoma paraensei*. **J Parasitol** 1989b; 75: 261–269.

172. Oliveira-Filho EC, Geraldino BR, Coelho DR, De-Carvalho RR, Paumgarten FJR. Comparative toxicity of *Euphorbia milli* latex and synthetic molluscicides to *Biomphalaria glabrata* embryos. **Chemosphere** 2010; 81: 218-227.
173. Panic G, Ingram K, Keiser J. Development of an *in vitro* drug sensitivity assay based on newly excysted larvae of *Echinostoma caproni*. **Parasit Vectors** 2013; 6:237.
174. Paraense WL, Corrêa LR. A potential vector of *Schistosoma mansoni* in Uruguay. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1989; 84: 281-288.
175. Paraense WL. The schistosome vectors in the Americas. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 2001; 96: 7–16.
176. Pietrock M, Marcogliese DJ, McLaughlin JD. Effects of cadmium upon longevity of *Diplostomum* sp. (Trematoda: Diplostomidae) cercariae. **Chemosphere** 2002; 47: 29–33.
177. Pietrock M, Marcogliese DJ. Free-living endohelminth stages: At the mercy of environmental conditions. **Trends Parasitol** 2003; 19: 293–299.
178. Pinaud S, Portela J, Duval D, Nowacki FC, Olive MA, Allienne JF, et al. A shift from cellular to humoral responses contributes to innate memory in the vector snail *Biomphalaria glabrata*. **PLoS Pathog** 2016; 12: 3-18.
179. Pinheiro J, Maldonado A, Lanfredi RM. Light and scanning electron microscopy of the miracidium of *Echinostoma paraensei* (Trematoda, Echinostomatidae). **Vet Parasitol** 2004a; 121(3-4): 265-275.
180. Pinheiro J, Maldonado AJ, Attias M, Lanfredi RM. Morphology of the rediae of *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae) from its intermediate host *Lymnaea columella* (Mollusca, Gastropoda). **Parasitol Res** 2004b; 93(3): 171-177.

181. Pinheiro J, Maldonado AJ, Attias M, Lanfredi RM. Ultrastructure of the miracidium of *Echinostoma paraensei* Lie and Basch, 1967 (Trematoda, Echinostomatidae). **Parasitol Res** 2005; 97(5):367-372.
182. Pinheiro J, Maldonado Júnior A, Lanfredi RM. Physiological changes in *Lymnaea columella* (Say, 1817) (Mollusca: Gastropoda) in response to *Echinostoma paraensei* Lie and Basch, 1967 (Trematoda:Echinostomatidae) infection. **Parasitol Res** 2009; 106: 55-59.
183. Pipe RK, Coles JA. Environmental contaminants influencing immune function in marine bivalve molluscs. **Fish Shellfish Immunol** 1995; 5: 581-595.
184. Portela J, Duval D, Rognon A, Galinier R, Boissier J, et al. Evidence for specific genotype-dependent immune priming in the lophotrochozoan *Biomphalaria glabrata* snail. **J Innate Immun** 2013; 5: 261–276.
185. Pounds JA, Bustamante MR, Coloma LA, Consuegra JA, Fogden MP, Foster PN, La Marca E, Masters KL, Merino-Viteri A, et al. Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. **Nature** 2006; 439: 161–167.
186. Raffel TR, Sheingold JL, Rohr JR. Lack of pesticide toxicity to *Echinostoma trivolvis* eggs and miracidia. **J Parasitol** 2009; 95:1548-1551.
187. Relyea R, Hoverman J. Assessing the ecology in ecotoxicology: a review and synthesis in freshwater systems. **Ecol Lett** 2006; 9: 1157-1171.
188. Rendón-von Osten J, Ortíz-Arana A, Guilhermino L, Soares AM. In vivo evaluation of three biomarkers in the mosquitofish (*Gambusia yucatana*) exposed to pesticides. **Chemosphere** 2005; 58(5):627-636.
189. Richard S, Moslemi S, Sipahutar H, Benachour N, Seralini GE. Differential effects of glyphosate and roundup on human placental cells and aromatase. **Environ Health Perspect** 2005; 113: 716-720.

190. Rico A, Sabater C, Castillo MA. Lethal and sub-lethal effects of five pesticides used in rice farming on the earthworm *Eisenia fetida*. **Ecotoxicol Environ Saf** 2016; 127:222-229.
191. Rizk AFM. Naturally Occurring Pyrrolizidine Alkaloids. CRC Press, Boca Raton, FL. 1991.
192. Rohr JR, Elskus AA, Shepherd BS, Crowley PH, McCarthy TM, Niedzwiecki JH, Sager T, Sih A, Palmer BD. Lethal and sublethal effects of atrazine, carbaryl, endosulfan and octylphenol on the streamside salamander (*Ambystoma barbouri*). **Environ Toxicol Chem** 2003; 22: 2385-2392.
193. Rohr JR, Elskus AA, Shepherd BS, Crowley PH, McCarthy TM, Niedzwiecki JH, Sager T, Sih A, Palmer BD. Multiple stressors and salamanders: Effects of herbicide, food limitation, and hydroperiod. **Ecol Appl** 2004; 14: 1028-1040.
194. Rohr JR, Palmer BD. Aquatic herbicide exposure increases salamander desiccation risk eight months later in a terrestrial environment. **Environ Toxicol Chem** 2005; 24:1253–1258.
195. Rohr JR, Raffel TR, Sessions SK, Hudson PJ. Understanding the net effects of pesticides on amphibian trematode infections. **Ecol Appl** 2008a; 18: 1743–1753.
196. Rohr JR, Schotthoefer AM, Raffel TR, Carrick HJ, Halstead N, Hoverman JT, Johnson CM, Johnson LB, Lieske C, et al. Agrochemicals increase trematode infections in a declining amphibian species. **Nature** 2008b; 455: 1235–1239.
197. Russo J, Lagadic L. Effects of environmental concentrations of atrazine on hemocyte density and phagocytic activity in the pond snail *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda, Pulmonata). **Environ Pollut** 2004; 127: 303–311.
198. Russo J, Lagadic L. Effects of parasitism and pesticide exposure on characteristics and functions of hemocyte populations in the

fresh water snail *Lymnaea palustris* (Gastropoda, Pulmonata). **Cell Biol Toxicol** 2000; 16: 15–30.

199. Russo J, Lefeuvre-Orfila L, Lagadic L. Hemocyte-specific responses to the peroxidizing herbicide fomesafen in the pond snail *Lymnaea stagnalis* (Gastro-poda, Pulmonata). **Environ Pollut** 2007; 146: 420–427.

200. Russo J, Madec L, Brehelin M. Haemocyte lysosomal fragility facing an environmental reality, A toxicological perspective with atrazine and *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda, Pulmonata) as a test case. **Ecotoxicol Environ Saf** 2009; 72: 1719–1726.

201. Sapp KK, Loker ES. A comparative study of mechanisms underlying digenean-snail specificity: in vitro interactions between hemocytes and digenean larvae. **J Parasitol** 2000; 86(5): 1020-1029.

202. Schmahl G, Mehlhorn H. Treatment of fish parasites. 1. Praziquantel effective against monogenea (*Dactylogyrus vastator*, *Dactylogyrus extensus*, *Diplozoon paradoxum*). **J Parasitenkd** 1985; 71(6):727-737.

203. Schmidt GD, Roberts LS. Digeneans: Echinostomatiformes. In: Foundations of Parasitology. 8 ed. New York, USA: McGraw-Hill Companies. 2009; p. 265-276.

204. Schonbrunn E, Eschenburg S, Shuttleworth WA, Schloss JV, Amrhein N, Evans JN, Kabsch W. Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2001; 98: 1376-1380.

205. Schultz JH, Adema CM. Comparative immunogenomics of molluscs. **Dev Comp Immunol** 2017; doi: 10.1016/j.dci.2017.03.013.

206. Sebelová S, Stewart MT, Mousley A, Fried B, Marks NJ, Halton DW. The musculature and associated innervation of adult and intramolluscan stages of *Echinostoma caproni* (Trematoda) visualised by confocal microscopy. **Parasitol Res** 2004; 93: 196-206.

207. Seta L, Magalhães LA, Carvalho JF. Comportamento dos amebócitos circulantes de moluscos planorbídeos frente ao parasitismo por larvas de *Schistosoma mansoni*, inoculação de tinta e fratura de concha. **Rev Saúde Pública** 1996; 30: 332-340.
208. Siddall R. Parasites as biological indicators of sewage sludge dispersal. PhD thesis, University of Aberdeen. 1992.
209. Sinhorin VDG, Sinhorin AP, Teixeira JMS, Mileski KML, Hansen PC, Moeller PR, et al. Metabolic and behavior changes in Surubim acutely exposed to a glyphosate-based herbicide. **Arch Environ Contam Toxicol** 2014; 67:659-667.
210. Skelly DK, Bolden SR, Holland MP, Freidenburg LK, Freidendfelds NA, Malcolm TR. Urbanization and disease in amphibians. In: Collinge SK, Ray C, editors. Disease ecology: community structure and pathogen dynamics. Oxford University Press, New York, New York, USA. 2006; p.153–167.
211. Snieszko SF. The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes. **J Fish Biol** 1974; 6: 197–208.
212. Sobhon P, Wanichanon C, Sattongdee P, Koonchornboon T, Bubphaniroj P, Upatham ES, et al. Scanning electron microscopic study of *Opisthorchis viverrini* tegument and its alterations induced by amoscanate. **Int J Parasitol** 1986; 16(1):19-26.
213. Solomon KR, Baker DB, Richards RP, Dixon KR, Klaine SJ, La Point TW, Kendall RJ, Weisskopf CP, Giddings JM, Giesy JP. Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters. **Environ Toxicol Chem** 1996; 15: 31-74.
214. Souza CP, Caldeira RL, Drummond SC, Melo AL, Guimarães CT, Soares DM, Carvalho OS. Geographical distribution of *Biomphalaria* snails in the state of Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 2001; 96: 293-302.



215. Souza J, Garcia J, Neves RH, Machado-Silva JR, Maldonado A. *In vitro* excystation of *Echinostoma paraensei* (Digenea: Echinostomatidae) metacercariae assessed by light microscopy, morphometry and confocal laser scanning microscopy. **Exp Parasitol** 2013; 135(4):701-707.
216. Souza JG, Garcia JS, Manso PP, Neves RH, Maldonado AJ, Machado-Silva JR. Development of the reproductive system of *Echinostoma paraensei* in *Mesocricetus auratus* analyzed by light and confocal scanning laser microscopy. **Exp Parasitol** 2011; 128(4): 341-346.
217. Souza JG, Lopes Torres EJ, Garcia JS, Gomes AP, Rodrigues e Silva R, Maldonado A, et al. Light and scanning electron microscopy study of *in vitro* effects of artesunate in newly excysted metacercariae of *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Digenea). **Exp parasitol** 2017; 174:10-16.
218. Speiser B, Harmatha J, Rowell-Rahier M. Effects of pyrrolizidine alkaloids and sesquiterpenes on snail feeding. **Oecologia** 1992; 92:257–265.
219. Stangarlin JR, Kuhn OJ, Schwan-Estrada KRF. Controle de doenças de plantas por extratos de origem vegetal. In: LUZ WC. Revisão Anual de Patologia de Plantas. 2008; 16: 265-304.
220. Stein PC, Basch PF. Metacercarial cyst formation *in vitro* of *Echinostoma paraensei*. **J Parasitol** 1977; 63: 1031-1040.
221. Sures B, Nachev M, Selbach C, Marcogliese DJ. Parasite responses to pollution: what we know and where we go in "Environmental Parasitology". **Parasit Vectors** 2017; 10(1):65.
222. Takahashi K, Horie M, Aoba N. Analysis of glyphosate and its metabolite, aminomethylphosphonic acid, in agricultural products by HPLC. **Shokuhin Eiseigaku Zasshi** 2001; 42: 304-308.

223. Tansatit T, Sahaphong S, Riengrojpitak S, Viyanant V, Sobhon P. *Fasciola gigantica*: The *in vitro* effects of artesunate as compared to triclabendazole on the 3-weeks-old juvenile. **Exp Parasitol** 2012; 131:8-19.
224. Tchounwou PB, Englande AJ Jr, Malek EA. The influence of selected environmental parameters on the toxicity of Bayluscide to *Schistosoma mansoni* miracidia. **Arch Environ Contam Toxicol** 1992; 23: 223–229.
225. Tellez M, Merchant M. Biomonitoring heavy metal pollution using an aquatic apex predator, the american alligator, and its parasites. **PLoS One** 2015; 10(11):1-18.
226. Theisen G. O mercado de agroquímicos. Disponível em: <[www.cnpsa.embrapa.br/met/images/arquivos/15MET/mercadoagroquimico.pdf](http://www.cnpsa.embrapa.br/met/images/arquivos/15MET/mercadoagroquimico.pdf)>. Acesso em: 05 de junho de 2018.
227. Thoden TC, Boppre M, Hallmann J. Effects of pyrrolizidine alkaloids on the performance of plant-parasitic and free-living nematodes. **Pest Manag Sci** 2009a; 65:823-830.
228. Thoden TC, Hallmann J, Boppre M. Effects of plants containing pyrrolizidine alkaloids on the northern root knot nematode *Meloidogyne hapla*. **Eur J Plant Pathol** 2009b; 123:27–36.
229. Tizhe EV, Ibrahim ND, Fatihu MY, Igbokwe IO, George BD, Ambali SF, Shallangwa JM. Serum biochemical assessment of hepatic and renal functions of rats during oral exposure to glyphosate with zinc. **Comp Clin Path** 2014; 23: 1043-1050.
230. Toledo R, Esteban JG, Fried B. Current status of food-borne trematode infections. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis** 2012; 31: 1705-1718.
231. Toledo R, Esteban JG. An update on human echinostomiasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 2016; 110: 37-45.
232. Toledo R, Radev V, Kanev I, Gardner SL, Fried B. History of Echinostomes (Trematoda). **Acta Parasitol** 2014; 59(4): 555-567.
233. Tolosa EMC, Rodrigues CJ, Behmer OA, Freitas-Neto AG.

Manual de técnicas para histologia normal e patológica. São Paulo, Brasil: Manole; 2003. p.37.

234. Tolstenkov OO, Akimova LN, Terenina NB, Gustafsson MKS. The neuromuscular system in continuously swimming cercariae from Belarus. II Echinostomata, Gymnocephala and Amphistomata. **Parasitol Res** 2012; 111: 2301-2309.

235. Toni LRM, Santana H, Zaia DAM. Adsorção de glifosato sobre solos e minerais. **Quim Nova** 2006; 29(4):829-833.

236. Tsui MTK, Chu LM. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. **Chemosphere** 2003; 52:1189-1197.

237. Tunholi VM, Lustrino D, Tunholi-Alves VM, Garcia JS, Mello-Silva CC, Maldonado Jr A, Rodrigues ML, Pinheiro J. Influence of *Echinostoma paraensei* (Lie and Basch, 1967) infection on the calcium content in *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Exp Parasitol** 2011a; 129(3): 266-269.

238. Tunholi VM, Lustrino D, Tunholi-Alves VM, Mello-Silva CC, Maldonado Jr A, Pinheiro J, Rodrigues ML. Biochemical profile of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Gastropoda) after infection by *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae). **Parasitol Res** 2011b; 109(3): 885-891.

239. Tunholi VM, Tunholi-Alves VM, Lustrino D, Castro RN, Sant Ana LD, Garcia JS, Maldonado Jr A, Santos MAJ, Rodrigues MLA, Pinheiro J. Aerobic to anaerobic transition in *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) infected with different miracidial doses of *Echinostoma paraensei* (Lie and Basch, 1967) by high-performance liquid chromatography. **Exp Parasitol** 2013; 133: 403-410.

240. Tunholi VM, Tunholi-Alves VM, Santos AT, Garcia JS, Maldonado Jr A, da-Silva WS, Rodrigues MLA, Pinheiro J. Evaluation of the mitochondrial in the gonad-digestive gland complex of *Biomphalaria glabrata*

(Mollusca, Gastropoda) after infection by *Echinostoma paraensei* (Trematoda, Echinostomatidae). **J Invertebr Pathol** 2016; 136: 136-141.

241. Van Dam NM, Vuister LWM, Bergshoeff C, De Vos H, Van der Meijden E. The 'raison d'être' of pyrrolizidine alkaloids in *Cynoglossum officinale*: deterrent effects against generalist herbivores. **J Chem Ecol** 1995; 21:507–523.

242. Van der Knaap WP, Loker ES. Immune mechanisms in trematode–snail interactions. **Parasitol Today** 1990; 6: 175–182.

243. Van der Putten WH, Van der Stoel CD. Plant parasitic nematodes and spatio-temporal variation in natural vegetation. **Appl Soil Ecol** 1998; 10: 253–262.

244. Vergote D, Bouchut A, Sautiere PE, Roger E, Galinier R, Rognon A et al. Characterisation of proteins differentially present in the plasma of *Biomphalaria glabrata* susceptible or resistant to *Echinostoma caproni*. **Int J Parasitol** 2005; 35: 215-224.

245. Viyanant V, Thirachantra S, Sornmani S. The effect of controlled release copper sulphate and tributyltin fluoride on the mortality and infectivity of *Schistosoma mansoni* cercariae. **J Helminthol** 1982; 56: 85–92.

246. Vutukuru SS. Acute effects of hexavalent chromium on survival, oxygen consumption, hematological parameters and some biochemical profiles of the Indian major carp, *Labeo rohita*. **Int J Environ Res Public Health** 2005; 2:456-462.

247. Williams GM, Kroes R, Munro IC. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. **Regul Toxicol Pharmacol** 2000; 31(2 Pt 1):117-165.

248. Wong S, Fournier M, Coderre D, Banska W, Krzstyniak K. Environmental immunotoxicology. In: Peakall, D. (Ed.), *Animals Biomarkers as Pollution Indicators*. Chapman and Hall, London. 1992. pp. 167–189.

249. World Health organization. *Em Glyphosate: Environmental Health Criteria 159*; Geneva: WHO, 1994.

250. World Health Organization. Public health impact of pesticides used in agriculture. Geneva: WHO 1990, 129p.
251. Xiao SH, Mei JY, Jiao PY. The *in vitro* effect of mefloquine and praziquantel against juvenile and adult *Schistosoma japonicum*. **Parasitol Res** 2009; 106(1):237-246.
252. Yamada T, Castro PRC. Efeitos do glifosato nas plantas: implicações fisiológicas e agrônômicas. International Plant Nutrition Institute. Piracicaba: Informações Agrônômicas. 2007. p. 24.
253. Zablotowicz RM, Reddy KN. Impact of glyphosate and *Bradyrhizobium japonicum* symbiosis; with glyphosate-resistant transgenic soybean: a minireview. **J Environ Qual** 2004; 33: 825-831.
254. Zasada IA, Halbrendt JM, Kokalis-Burelle N, LaMondia J, McKenry MV, Noling, JW. Managing nematodes without methyl bromide. **Annu Rev Phytopathol** 2010; 48: 311–328.

## **ANEXOS**

## Mini Review

# What do we know about the Effects of Pesticides on Helminths?

Tainá C de C Monte<sup>1,2</sup> and Arnaldo Maldonado Júnior<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Saúde, Instituto Oswaldo Cruz, Brazil

<sup>2</sup>Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, Instituto Oswaldo Cruz, Brazil

## \*Corresponding author

Arnaldo Maldonado Júnior, Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Avenida Brasil 4365, Manguinhos, CEP 21040-360, Rio de Janeiro, Brazil, Tel: 55-21-2562-1644; Email: arnaldomaldonadojunior@gmail.com; maldonad@ioc.fiocruz.br

Submitted: 21 March 2017

Accepted: 10 April 2017

Published: 12 April 2017

ISSN: 2475-9392

## Copyright

© 2017 Júnior et al.

## OPEN ACCESS

## K Abstract

The term pesticides refer to compounds used to control pests and/or promote agricultural output. Although pesticides are formulated to be harmful only to one or a group of target organisms, this is often not achieved in practice. In recent years, the effect of agricultural activities on wildlife diseases has received much attention, especially those related to contaminants that affect host-pathogen interactions. This mini review focuses mainly on the effects of pesticides on helminths, summarizing the principal compounds that can influence the transmission or the biology of these parasites. The environmental changes caused by pesticides and consequent impact on host-parasite interactions are a major concern since they are implicated in the emergence or reemergence of various parasitic organisms in recent years. For example, it has been suggested that the amphibian population decline is closely linked to these environmental changes, especially because the pesticide exposure affects the host immunity, increasing the prevalence of trematode infection. The use of helminths under experimental conditions has been useful since it is possible to elucidate physiological, biological and morphological effects caused by pesticides. The biological effects on the larval stages of trematodes has received special attention since they require the aquatic environment to complete their life cycle and are thus more exposed to contaminants. Other research efforts have been directed at phytonematodes, to obtain alternative control/management chemicals that are less toxic to the environment than conventional ones. It is important to carry out studies to discover new strategies that minimize toxicity of the compounds currently used, focusing a more specific mechanism of action on the target organisms, and clarify the relevance on the helminths transmission

- Pesticides
- Helminthes
- Environmental changes

## ABBREVIATIONS

EPA: Environmental Protection Agency; PAs: 1,2-dehydropyrrolizidine Alkaloids; POEA: Polyethoxylated tallow Amine; DDT: Dichlorodiphenyltrichloroethane

## INTRODUCTION

The term pesticides refer to compounds used to control pests and/or promote agricultural output. Among the main classes are insecticides, herbicides, fungicides, molluscicides, rodenticides and nematicides. Organochlorine insecticides were successfully used to control a number of diseases, such as malaria, until the 1960s when they were banned due to harmful side effects, such as slow decomposition (high persistence), environmental degradation, low solubility in water, high solubility in hydrocarbon-sensitive media such as fatty tissues of living organisms, and high toxicity to insects and humans [1,2]. After that, from the 1960s to 1980s, organophosphate insecticides,

carbamates and pyrethroids were introduced, as well as new herbicides and fungicides from 1970s onwards [1]. According to the U.S. Environmental Protection Agency (EPA), expenditures on herbicides are the largest portion of total expenditures on pesticides (40%), followed by insecticides, fungicides and other pesticides, respectively [3].

It is accepted that the use of pesticides increases production of food and reduces vector-borne diseases. However, serious health implications to humans and the environment also result from their use. The high groups at highest risk of exposure to pesticides are farm workers, especially those involved in formulating, mixing, loading and spraying pesticides. However, no segment of the population is completely protected against exposure to pesticides and the potentially serious health effects, particularly in developing countries. Estimates are that chronic diseases caused by exposure to pesticides affect about 1 million per year worldwide [4,5].

In addition to human health, these compounds contaminate the soil, water and vegetation and are toxic to many organisms, including birds, fish, beneficial insects and non-target plants [1]. In recent years, the effect of agricultural activities on wildlife diseases has received much attention, mainly those related to contaminants that affect host-pathogen interactions. These effects are also associated with modifications of potential physical interactions between hosts and pathogens, causing loss of biodiversity and affecting parasite transmission [6-8].

This mini review examines the effects of pesticides on helminths, focusing on the host-parasite interaction, particularly in the larval free-living stages of trematodes (miracidia and cercariae), and helminths used as experimental models and plant-parasitic nematodes to elucidate the effects on the biology of these parasites, summarizing the main compounds studied that can influence the transmission of these helminths (Figure 1).

### The effects of pesticides on parasitism

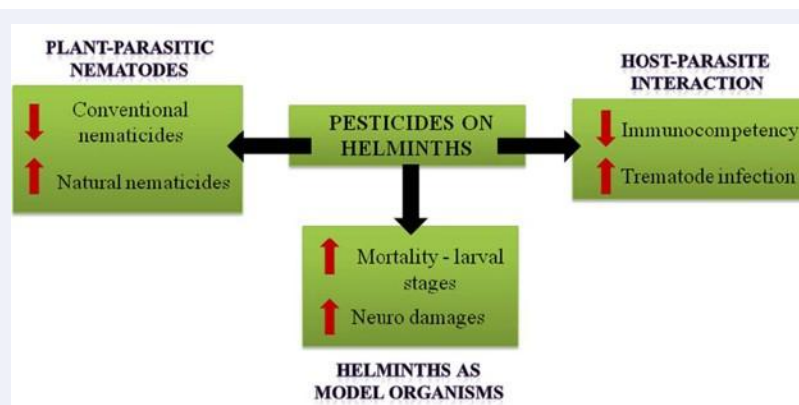
Parasite transmission is strongly influenced by environmental changes, which can alter specific interactions of hosts, parasites, biotic and abiotic factors [9,10]. According to Bolker et al. [11], the factors that affect host and parasite ecology can be divided into those that are lethal and sublethal. While lethal factors reduce the density of hosts and/or parasites, sublethal factors alter the host immunity and/or parasite infectivity, consequently affecting the disease dynamics. These anthropogenic factors, such as the use of pesticides, can have concurrent positive and negative effects on parasite transmission, making it necessary to understand and quantify their net effects on disease emergence [10,12].

Net effects are the product of changes of survival and traits of both hosts and parasites, such as susceptibility and infectivity. Most research conducted to investigate host-parasite interaction related to pesticide exposure is focused on amphibians, because of their global decline [10,13,14]. Trematode infections of amphibians have received research attention because some species of trematodes are considered to be emerging parasites capable of causing limb deformities driven by anthropogenic environmental change [10,12,15-17]. Pesticides are among the factors that probably affect disease prevalence and intensity and are considered directly toxic to hosts and free-living stages of parasites, by altering their behavior and immunity, affecting parasite transmission and virulence [10,12,18-22].

The herbicide atrazine has been employed in different amphibian-trematode interaction studies with the purpose of evaluating its role as a driver of disease risk [10,12,23]. It is believed that atrazine increases the food source of gastropods (first intermediate host of trematodes), consequently increasing the abundance of trematode cercariae and the exposure of amphibians to infection [12,24]. Kiesecker [15] demonstrated in field and laboratory experiments that trematode infection explains the development of amphibian limb deformities. The exposure to pesticides, such as atrazine, malathion and esfenvalerate, in areas of agricultural runoff was found to decrease the host immunocompetency, resulting in higher parasite loads and limb deformities.

In an experimental study carried out by Rohn et al. [10], assessing the effect of two herbicides (the triazine herbicide atrazine and the glycine herbicide glyphosate) and two insecticides (the organophosphate insecticide malathion and the carbamate insecticide carbaryl) on six important mechanisms of host-parasite interaction (cercarial survival, tadpole survival, snail survival, snail growth and fecundity, cercarial infectivity, and tadpole susceptibility) using the trematode *Echinostoma trivolvis* and its first and second intermediate host, the snail *Planorbella trivolvis* and tadpoles of the green frog *Rana clamitans*, respectively. They observed that only atrazine significantly reduced cercarial survival at concentrations greater than found in aquatic ecosystems. No evidence was found that the pesticide treatments significantly affected the first intermediate snail host traits under the tested conditions. However, the sublethal exposure of *R. clamitans* to each of the four pesticides increased their susceptibility to infection, suggesting a negative impact of pesticides on second intermediate host immunity, increasing the infections caused by trematodes in amphibians, which could be one of the factors leading to their population decline.

The survival of parasites depends on successful transmission of infective stages to hosts. The free-living stages of trematodes (miracidia and cercariae), face challenges such as predation, the need to find suitable host and external environmental factors in their macrohabitats [25,26]. Abiotic factors (temperature, oxygen content and pH) and anthropogenic activities can influence the occurrence of parasites, affecting trematode infections since they are vulnerable to these factors. Several studies have been conducted of the influence of pollutants, especially heavy metals, on cercarial sensitivity [27-29]. Pesticides also have been shown





to have deleterious effects on miracidia and cercariae, as observed with molluscicides [30-32] and dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) insecticides [33].

Koprivnikar et al. [26], showed under experimental conditions the effects of atrazine on cercariae of four different trematode species: *Haematoloechus*, *Alaria*, *Megalodiscus* and *E. trivolvis*. The mortality and activity of cercariae varied among species and atrazine exposure was responsible for decreasing the ability of *E. trivolvis* to infect amphibians and the intensity of infection as well. More recently, Raffel et al. [34], found no evidence of biological effects when eggs and miracidia of *E. trivolvis* were exposed to the four pesticides cited above, including atrazine and glyphosate in high concentrations [10]. It is believed that cercariae are more sensitive than miracidia due to the longer exposure period to pesticides as a consequence of the longer life span and faster speed of contaminant uptake.

### Effects of pesticides on helminths used as model organisms

Some helminth species have been used over the years as model organisms under experimental conditions for different purposes, such as *in vitro* and *in vivo* assays to screen potential commercial drugs with anthelmintic potential [35,36]. Among these are species of the genus *Echinostoma*, mainly *Echinostoma paraensei* and *Echinostoma caproni* [22,37-41]. Their adoption as a model stems in part from the fact that their life cycle is easy to reproduce under laboratory conditions, requiring low equipment and maintenance costs [42,43]. The most common research focus is about the biological effects of pesticides on the larval stages of trematodes, since they require the aquatic environment to complete their life cycle, meaning greater exposure to contaminants [22,26,34]. The nematode *Caenorhabditis elegans* has emerged as an important model organism in aquatic and soil toxicology research, especially for environmental toxicity assessment of urban areas where water quality is threatened by agricultural activities, sewage and industrial effluents [44]. Moreover, since *C. elegans* is a soil nematode, its use as a model organism can also help elucidate the effects of various pesticides used to control phytonematodes.

An ideal pesticide should have the ability to kill a single target pest without harming non-target organisms, including free-living stages of trematodes. Recently, Monte et al. [22], showed the effect of the commercial formulation of the herbicide glyphosate, Roundup®, on different developmental stages of the trematode *E. paraensei*, both *in vitro* and *in vivo*, using concentrations below that recommended by the manufacturer. In this study, it was possible to observe that all stages (eggs, miracidia, cercariae, newly excysted larvae and adult helminths) presented concentration-dependent mortality when exposed to the Roundup® under experimental conditions, highlighting the possibility of herbicide interference in the transmission dynamics of the parasite.

The miracidial and cercarial stages, which need aquatic environments to reach the intermediate host, showed high mortality when exposed to Roundup® *in vitro*, particularly the miracidial stage. This may be related to the fact that the cercariae are covered by glycocalyx, which coats the tegument and may act as a physical barrier to Roundup® [45], while miracidia have epidermal plates with interepidermal spaces, which can facilitate the herbicide's penetration [46]. It has also been suggested that the herbicide influences the neuromuscular system and

energetic metabolism of these larval stages, affecting the success of transmission. Moreover, adult helminths presented a concentration-dependent mortality, which can be related to the possible cell damage caused by the surfactant POEA, which it is believed to be more toxic than the active ingredient [47- 50].

The neurodegenerative effects caused by herbicides containing glyphosate and fungicides containing Mn was observed by Negga et al. [51,52], using the nematode *C. elegans* as a model organism to analyze the relationship of pesticide usage and the incidence of Parkinson's disease. They observed a reduction of neurons due to chronic exposure. McVey et al. [53], also performed a study with *C. elegans* to analyze if unhatched worms exposed to a glyphosate-containing herbicide during the egg stage show abnormal neurodevelopment after hatching. The results indicated statistically significant decrease in neurons and increase in superoxide levels, suggesting that early exposure to the herbicide can impair neuronal development of helminths and that exposure to toxic substances such as pesticides during development may cause individuals to be susceptible to neurodegenerative diseases later in life.

An interesting strategy to assess the real toxicity of active ingredients on helminths would be to conduct *in vitro* tests comparing the effects of its alone and the commercial formulation, in order to analyze the possibility to reduce damage to non-target organisms.

### Effects on plant-parasitic nematodes

Plant parasitic nematodes are small, soil-borne pathogens responsible for causing damage in agricultural crops, with estimated losses of US\$ 80 billion per year [54]. There are over than 4,100 species of nematodes, displaying a variety of interactions with their hosts. These helminths can be migratory ectoparasites, migratory endoparasites, or semi-endoparasitic nematodes [55]. The most economically important are the root-knot and cyst nematodes, which are biotrophic and equipped with complex feeding structures that are introduced in the roots of their host, allowing them to have a rich and long-lasting food source [56]. Over the years, some chemicals have been employed to control these nematodes, especially fumigant nematicides (methyl bromide), but their uses have been restricted because they can be harmful to the environment and non-target organisms [57,58]. The search for alternative control measures to replace conventional nematicides is a global concern, justifying research of natural substances because of their possible efficiency and lower environmental damage [59-62].

The southern root-knot *Meloidogyne incognita* is the most important plant parasitic nematode species and can attack more than 3,000 agricultural crops, resulting in significant yield losses. Cheng et al. [63], tested the effect of the biological insecticide emamectin benzoate, which is derived from naturally occurring avermectin molecules isolated from the soil bacterium *Streptomyces avermitilis*, on the management of *M. incognita* in laboratory, greenhouse and field experiments. In all trails, emamectin benzoate showed good efficacy against *M. incognita* without damaging the growth of plants. More recently, Martins & Santos [62], analyzed the nematicidal effect of different plant extracts on *M. incognita*. They observed high nematicidal activity with citronella grass and mint extracts (70%) and total

mortality with watercress extracts. After exposure, the larvae that remained active were inoculated on tomato seedlings to evaluate their infectivity and the toxic effect of these extracts on the parasitic nematodes was confirmed.

Another alternative to replace synthetic nematicides is the use of plants or their secondary metabolites as sources of nematocidal extracts. The 1,2-dehydropyrrolizidine alkaloids (PAs) are a group of secondary plants metabolites that have the function of protecting plants by repelling vertebrates, insects, snails and even soil-borne nematodes, although some studies have demonstrated that nematodes are not repelled by them but that plants can suppress nematode reproduction [64-74]. Thoden et al. [64], showed the significant reduction of northern root-knot nematode *Meloidogyne hapla* in infested soils through cultivation and incorporation of plants that produce PAs. Additionally, Thoden et al. [65], carried out a study to elucidate the effects of these plant metabolites on the performance of both plant-parasitic and free-living nematodes. The results showed the ovicidal, nematocidal and repellent effects induced by PAs in different nematodes and this toxicity was related to the structural types of PAs. These plant metabolites are considered a promising alternative for nematode management.

## DISCUSSION & CONCLUSION

Environmental stresses, such as pollution caused by pesticides, have diverse effects both for humans and the environment. Little research has been done about the effects of these contaminants on helminths. Instead, the focus has mainly been on other organisms considered more exposed to pesticides, such as birds, fish and amphibians [75-80]. The effects of glyphosate-based herbicides on survival, development, sex ratio and growth of wood frogs under laboratory conditions were demonstrated by Navarro-Martín et al. [78], and Lanctôt et al. [79], showing the influence of these chemicals on metamorphosis by altering mRNA gene profiles, although studies in natural systems are needed to corroborate these findings. These results suggest that in addition to host immunity, other biological factors can affect the host-parasite interaction and contribute to amphibian population decline from exposure to pesticides.

The use of helminths under experimental conditions has been useful since it is possible to elucidate physiological, biological and morphological effects caused by pesticides. The most common research topic is the biological effects on the larval stages of trematodes [22,26,34] and phytonematodes [61-63]. In the latter case, studies with these nematodes are used to obtain alternative control/management using PAs, which that are less toxic to the environment than the conventional substances. Repellent effects caused by PAs were observed by Thoden et al. [65], for *Rhabditis* adult's nematodes, but no repellency was observed for *M. incognita* juveniles. In addition, juvenile forms of *M. hapla* were not able to complete their life cycle or their reproduction was reduced when PA-producing plants were infested by this species, impacting host-parasite interaction as well [64]. These findings provide further evidence that differences in the susceptibility are strongly related to different species and different chemical forms of PAs. The adult stages of helminths have great value since they can show the physiological and ultrastructural impacts of pesticides, such as at the nervous and cellular level, which also

could contribute to control/management of these parasites by discovering the mode of action of these substances or elucidating the possible interference in the transmission dynamics of helminths.

This mini review has discussed the interface of helminths and pesticides, highlighting how these compounds can affect this biological interaction, particularly parasitic trematodes, soil nematodes and plant-parasitic nematodes. It is important to carry out studies to discover new strategies that minimize toxicity of the compounds currently used, focusing a more specific mechanism of action on the target organisms, and clarify the relevance on the helminths transmission.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank to Program in Biodiversity and Health (PPGBS), Vice Presidency of Education, Information and Communication (VPEIC) of Oswaldo Cruz Institute/Fiocruz, the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (400061/2013-9), for financial support.

## REFERENCES

1. Aktar W, Sengupta D, Chowdhury A. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdiscip Toxicol.* 2009; 2: 1-12.
2. Jardim ICSF, Andrade JA, Queiroz SCN. Residues of pesticides in food: a global environmental preoccupation - focussing on apples. *Quim Nova.* 2009; 32: 996-1012.
3. Grube A, Donaldson D, Kiely T, Wu L. Pesticides industry sales and usage - 2006 and 2007 market estimates. *US Environmental Protection (US EPA).* 2011; 41.
4. Leng ML, Leovey EMK, Zubkoff PL. *Agrochemical environmental fate: state of art.* 1st ed. Lewis Publishers. USA. 1995.
5. World Health Organization (WHO). *Public health impact of pesticides used in agriculture.* Geneva. 1990; 129.
6. Bradley CA, Altizer S. Urbanization and the ecology of the wildlife diseases. *Trends Ecol Evol.* 2007; 22: 95-102.
7. Lehrer EW, Fredebaugh SL, Schooley RL, Mateus-Pinilla NE. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in woodchucks across an urban-rural gradient. *J Wildl Dis.* 2010; 46: 977-980.
8. Koprivnikar J, Redfern JC. Agricultural effects on amphibian parasitism: importance of general habitat perturbations and parasite life cycles. *J Wildl Dis.* 2012; 48: 925-936.
9. Lafferty KD, Kuris AM. How environmental stress affects the impacts of parasites. *Limnol Oceanogr.* 1999; 44: 925-931.
10. Rohn JR, Raffel TR, Sessions SK, Hudson PJ. Understanding the net effects of pesticides on amphibian trematode infections. *Ecol Appl.* 2008; 18: 1743-1753.
11. Bolker B, Holyoak M, Krivan V, Rowe L, Schmitz O. Connecting theoretical and empirical studies of traitmediated interactions. *Ecology.* 2003; 84: 1101-1114.
12. Rohn JR, Schotthoefer AM, Raffel TR, Carrick HJ, Halstead N, Hoverman JT, et al. Agrochemicals increase trematode infections in a declining amphibian species. *Nature.* 2008; 455: 1235-1239.
13. Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD. Infectious diseases and amphibian populations declines. *Divers Distrib.* 2003; 9: 141-150.
14. Pounds JA, Bustamante MR, Coloma LA, Consuegra JA, Fogden MP,

Foster PN, et al. Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Nature*. 2006; 439: 161-167.

15. Kiesecker JM. Synergism between trematode infection and pesticide exposure: a link to amphibian limb deformities in nature? *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99: 9900-9904.
16. Johnson PTJ, Sutherland DR. Amphibian deformities and Ribeiroia infection: an emerging helminthiasis. *Trends Parasitol*. 2003; 19: 332-335.
17. Skelly DK, Bolden SR, Holland MP, Freidenburg LK, Freidenfelds NA, Malcolm TR. Urbanization and disease in amphibians. In: Collinge SK, Ray C, editors. *Disease ecology: community structure and pathogen dynamics*. Oxford University Press, New York, USA. 2006; 153-167.
18. Relyea R, Hoverman J. Assessing the ecology in ecotoxicology: a review and synthesis in freshwater systems. *Ecol Lett*. 2006; 9: 1157-1171.
19. Rohn JR, Elskus AA, Shepherd BS, Crowley PH, McCarthy TM, Niedzwiecki JH, et al. Lethal and sublethal effects of atrazine, carbaryl, endosulfan and octylphenol on the streamside salamander (*Ambystoma barbouri*). *Environ Toxicol Chem*. 2003; 22: 2385-2392.
20. Rohn JR, Elskus AA, Shepherd BS, Crowley PH, McCarthy TM, Niedzwiecki JH, et al. Multiple stressors and salamanders: Effects of herbicide, food limitation, and hydroperiod. *Ecol Appl*. 2004; 14: 1028-1040.
21. Rohr JR, Palmer BD. Aquatic herbicide exposure increases salamander desiccation risk eight months later in a terrestrial environment. *Environ Toxicol Chem*. 2005; 24: 1253-1258.
22. Monte TCC, Garcia J, Gentile R, Vasconcelos MC, Souza J, Braga BV, et al. *In vivo* and *in vitro* effects of the herbicide Roundup® on developmental stages of the trematode *Echinostoma paraensei*. *Exp Parasitol*. 2016; 169: 43-50.
23. Koprivnikar J, Forbes MR, Baker RL. Contaminant effects on host-parasite interactions: Atrazine, frogs and trematodes. *Environ Toxicol Chem*. 2007; 26: 2166-2170.
24. Brock TCM, Larh J, Van den Brink PJ. Ecological risks of pesticides in freshwater ecosystems Part 1: Herbicides Alterra-Rapport 088 (Alterra, Green World Research). 2000.
25. Pietrock M, Marcogliese DJ. Free-living endohelminth stages: At the mercy of environmental conditions. *Trends Parasitol*. 2003; 19: 293-299.
26. Koprivnikar J, Forbes MR, Baker RL. Effects of atrazine on cercarial longevity, activity, and infectivity. *J Parasitol*. 2006; 92: 306-311.
27. Morley NJ, Crane M, Lewis JW. Toxicity of cadmium and zinc to *Diplostomum spathaceum* (Trematoda: Diplostomidae) cercarial survival. *Int J Parasitol*. 2001; 31: 1211-1217.
28. Morley NJ, Irwin SWB, Lewis JW. Pollution toxicity to the transmission of larval digeneans through their molluscan hosts. *Parasitology*. 2003; 126: S5-S26.
29. Pietrock M, Marcogliese DJ, McLaughlin JD. Effects of cadmium upon longevity of *Diplostomum* sp. (Trematoda: Diplostomidae) cercariae. *Chemosphere*. 2002; 47: 29-33.
30. Ghandour AM, Webbe G. The effect of sublethal concentrations of the molluscicide niclosamide on the infectivity of *Schistosoma mansoni* cercariae. *J Helminthol*. 1975; 49: 245-250.
31. Viyanant V, Thirachantra S, Sornmani S. The effect of controlled release copper sulphate and tributyltin fluoride on the mortality and infectivity of *Schistosoma mansoni* cercariae. *J Helminthol*. 1982; 56: 85-92.
32. Tchounwou PB, Englande AJ, Malek EA. The influence of selected environmental parameters on the toxicity of Bayluscide to *Schistosoma mansoni* miracidia. *Arch Environ Contam Toxicol*. 1992; 23: 223-229.
33. Kuntz RE, Stirewalt MA. Effects of DDT on cercariae of *Schistosoma mansoni*. *J Parasitol*. 1946; 32: 529-538.
34. Raffel TR, Sheingold JL, Rohr JR. Lack of pesticide toxicity to *Echinostoma trivolvis* eggs and miracidia. *J Parasitol*. 2009; 95: 1548-1551.
35. Ferraz J, Souza J, Costa-Silva M, Torres E, Santana A, Lanfredi R, et al. Effect of praziquantel on adult *Echinostoma paraensei* worms in experimentally infected mice. *Parasitol Res*. 2012; 111: 143-148.
36. Gonçalves JP, Oliveira-Menezes A, Maldonado Júnior A, Carvalho TMU, Souza W. Evaluation of praziquantel effects on *Echinostoma paraensei* ultrastructure. *Vet Parasitol*. 2013; 194: 16-25.
37. Souza J, Garcia J, Neves RH, Machado-Silva JR, Maldonado A. *In vitro* excystation of *Echinostoma paraensei* (Digenea: Echinostomatidae) metacercariae assessed by light microscopy, morphometry and confocal laser scanning microscopy. *Exp Parasitol*. 2013; 135: 701-707.
38. Souza JG, Lopes Torres EJ, Garcia JS, Gomes AP, Rodrigues e Silva R, Maldonado A, et al. Light and scanning electron microscopy study of *in vitro* effects of artesunate in newly excysted metacercariae of *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Digenea). *Exp parasitol*. 2017; 174: 10-16.
39. Maldonado Júnior A, Vieira GO, Garcia JS, Rey L, Lanfredi RM. Biological aspects of a new isolate of *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae): susceptibility of sympatric snails and the natural vertebrate host. *Parasitol Res*. 2001; 87: 853-859.
40. Garcia JS, Hooper CS, Simões RO, Santos MAJ, Maldonado Júnior A, Pinheiro J. Biochemical and histological responses of *Rattus norvegicus* (Wistar) infected by *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae). *Vet Parasitol*. 2011; 178: 86-92.
41. Panic G, Ingram K, Keiser J. Development of an *in vitro* drug sensitivity assay based on newly excysted larvae of *Echinostoma caproni*. *Parasit Vectors*. 2013; 6: z237.
42. Fried B. Maintenance, cultivation, and excystation of echinostomes. In: Fried B, Graczyk TK. *Echinostomes as experimental models for biological research*. Netherlands. Kluwer Academic Publishers. 2000; 99-114.
43. Maldonado Júnior A, Zeitone BK, Amado LA, Rosa IF, Machado-Silva JR, Lanfredi RM. Biological variation between two Brazilian geographical isolates of *Echinostoma paraensei*. *J Helminthol*. 2005; 79: 345-351.
44. Clavijo A, Kronberg MF, Rossen A, Moya A, Calvo D, Salatino SE, et al. The nematode *Caenorhabditis elegans* as an integrated toxicological tool to assess water quality and pollution. *Sci Total Environ*. 2016; 569-570: 252-261.
45. Dorsey CH, Cousin CE, Lewis FA, Stirewalt MA. Ultrastructure of the *Schistosoma mansoni* cercaria. *Micron*. 2002; 33: 279-323.
46. Pinheiro J, Maldonado A, Lanfredi RM. Light and scanning electron microscopy of the miracidium of *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae). *Vet Parasitol*. 2004; 121: 265-275.
47. Adam A, Marzuki A, Abdul Rahman H, Abdul Aziz M. The oral and intratracheal toxicities of Roundup® and its components to rats. *Vet Hum Toxicol*. 1997; 39: 147-151.
48. Tsui MTK, Chu LM. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere*. 2003; 52: 1189-1197.
49. Benachour N, Seralini GE. Glyphosate formulations induce apoptosis



- and necrosis in human umbilical, embryonic and placental cells. *Chem Res Toxicol.* 2009; 22: 97-105.
50. Mesnage R, Bernay B, Séralini GE. Ethoxylated adjuvants of glyphosate-based herbicides are active principles of human cell toxicity. *Toxicology.* 2013; 313, 122-128.
  51. Negga R, Rudd DA, Davis NS, Justice AN, Hatfield HE, Valente AL, et al. Exposure to Mn/Zn ethylene-bis- dithiocarbamate and glyphosate pesticides leads to neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans*. *Neurotoxicology.* 2011; 32: 331-341.
  52. Negga R, Stuart JA, Machen ML, Salva J, Lizek AJ, Richardson SJ, et al. Exposure to glyphosate- and/or Mn/ Zn-ethylene-bis-dithiocarbamate-containing pesticides leads to degeneration of gamma-aminobutyric acid and dopamine neurons in *Caenorhabditis elegans*. *Neurotox Res.* 2012; 21: 281-290.
  53. McVey KA, Snapp IB, Johnson MB, Negga R, Pressley AS, Fitsanakis VA. Exposure of *C. elegans* eggs to a glyphosate-containing herbicide leads to abnormal neuronal morphology. *Neurotoxicol Teratol.* 2016; 55: 23-31.
  54. Nicol JM, Turner SJ, Coyne DL, den Nijs L, Hockland S, Maafi ZT. Current nematode threats to world agriculture. In: Jones JT, Gheysen G, Fenoll C, editors. *Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions.* Heidelberg: Springer. 2011; 21-44.
  55. Jones JT, Haegeman A, Danchin EGJ, Gaur HS, Helder J, Jones MGK, et al. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol.* 2013; 14: 946-961.
  56. Van Megen H, van den Elsen S, Holterman M, Karssen G, Mooyman P, Bongers T, et al. A phylogenetic tree of nematodes based on about 1200 full-length small subunit ribosomal DNA sequences. *Nematology.* 2009; 11: 927-950.
  57. Giannakou IO, Sidiropoulos A, Prophetou-Athanasiadou D. Chemical alternatives to methyl bromide for the control of root-knot nematodes in greenhouses. *Pest Manag Sci.* 2002; 58: 290-296.
  58. Zasada IA, Halbrendt JM, Kokalis-Burelle N, LaMondia J, McKenry MV, Noling JW. Managing nematodes without methyl bromide. *Annu Rev Phytopathol.* 2010; 48: 311-328.
  59. Franzener G, Martinez-Franzener AS, Stangarlin JR, Furlanetto C, Schwan-Estrada KRF. Proteção de tomateiro a *Meloidogyne incognita* pelo extrato aquoso de *Tagetes patula*. *Nematologia Brasileira.* 2007; 31: 27-36.
  60. Stangarlin JR, Kuhn OJ, Schwan-Estrada KRF. Controle de doenças de plantas por extratos de origem vegetal. In: LUZ WC. *Revisão Anual de Patologia de Plantas.* 2008; 16: 265-304.
  61. Carboni RZ, Mazzonetto F. Efeito do extrato aquoso de diferentes espécies vegetais no manejo de *Meloidogyne incognita* em tomateiro em ambiente protegido. *Revista Agrogeoambiental.* 2013; 5: 61-66.
  62. Martins MCB, Santos CDG. Ação de extratos de plantas medicinais sobre juvenis de *Meloidogyne incognita* raça 2. *Revista Ciencia Agronomica.* 2016; 47: 135-142.
  63. Cheng X, Liu X, Wong H, Ji X, Wang K, Wei M, et al. Effect of Emamectin benzoate on root-knot nematodes and tomato yield. *Plos One.* 2015.
  64. Thoden TC, Hallmann J, Boppre M. Effects of plants containing pyrrolizidine alkaloids on the northern root knot nematode *Meloidogyne hapla*. *Eur J Plant Pathol.* 2009; 123: 27-36.
  65. Thoden TC, Boppre M, Hallmann J. Effects of pyrrolizidine alkaloids on the performance of plant-parasitic and free-living nematodes. *Pest Manag Sci.* 2009; 65: 823-830.
  66. Mattocks AR. Toxicity of pyrrolizidine alkaloids. *Nature.* 1968; 217: 723-728.
  67. Dreyer DL, Jones KC, Molyneux RJ. Feeding deterrence of some pyrrolizidine, indolizidine, and quinolizidine alkaloids towards Pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*) and evidence for phloem transport of indolizidine alkaloid swainsonine. *J Chem Ecol.* 1985; 11: 1045-1051.
  68. Rizk AFM. *Naturally Occurring Pyrrolizidine Alkaloids.* CRC Press, Boca Raton, FL. 1991.
  69. Speiser B, Harmatha J, Rowell-Rahier M. Effects of pyrrolizidine alkaloids and sesquiterpenes on snail feeding. *Oecologia.* 1992; 92: 257-265.
  70. Hare JF, Eisner T. Pyrrolizidine alkaloid deters ant predators of *Utetheisa ornatrix* eggs: effects of alkaloid concentration, oxidation state, and prior exposure of ants to alkaloid-laden prey. *Oecologia.* 1993; 96: 9-18.
  71. Van Dam NM, Vuister LWM, Bergshoeff C, De Vos H, Van der Meijden E. The 'raison d'être' of pyrrolizidine alkaloids in *Cynoglossum officinale*: deterrent effects against generalist herbivores. *J Chem Ecol.* 1995; 21: 507-523.
  72. Narberhaus I, Zintgraf V, Dobler S. Pyrrolizidine alkaloids on three trophic levels - evidence for toxic and deterrent effects on phytophages and predators. *Chemoecology.* 2005; 15: 121-125.
  73. Dominguez DM, Reina M, Santos-Guerra A, Santana O, Agullo T, Lopez-Balboa C, et al. Pyrrolizidine alkaloids from Canarian endemic plants and their biological effects. *Biochem Sys Ecol.* 2008; 36: 153-166.
  74. Van der Putten WH, Van der Stoel CD. Plant parasitic nematodes and spatio-temporal variation in natural vegetation. *Appl Soil Ecol.* 1998; 10: 253-262.
  75. Benachour N, Sipahutar H, Moslemi S, Gasnier C, Travert C, Séralini GE. Time- and dose- dependent effects of Roundup® on human embryonic and placental cells. *Arch Environ Contam Toxicol.* 2007; 53: 126-133.
  76. Lushchark OV, Kubrak OI, Storey JM, Storey KB, Lushchark VI. Low toxic herbicide Roundup® induces mild oxidative stress in goldfish tissues. *Chemosphere.* 2009; 76: 932-937.
  77. Hock SD, Poulin R. Exposure of the snail *Potamopyrgus antipodarum* to herbicide boosts output and survival of parasite infective stages. *Int J Parasitol Parasites Wildl.* 2012; 15: 13-18.
  78. Navarro-Martin L, Lanctôt C, Jackman P, Park BJ, Doe K, Pauli BD, et al. Effects of glyphosate-based herbicides on survival, development, growth and sex ratios of wood frog (*Lithobates sylvaticus*) tadpoles. I: chronic laboratory exposures to VisionMax®. *Aquat Toxicol.* 2014; 154: 278-290.
  79. Lanctôt C, Navarro-Martin L, Robertson C, Park B, Jackman P, Pauli BD, et al. Effects of glyphosate-based herbicides on survival, development, growth and sex ratios of wood frog (*Lithobates sylvaticus*) tadpoles. II: Agriculturally relevant exposures to Roundup® Weather Max and Vision under laboratory conditions. *Aquat Toxicol.* 2014; 154: 291-303.
  80. Koprivnikar J. Interactions of environmental stressors impact survival and development of parasitized larval amphibians. *Ecol Appl.* 2010; 20: 2263-2272.

## Cite this article

de C Monte TC, Júnior AM (2017) What do we know about the Effects of Pesticides on Helminths? *JSM Biol* 2(1): 1008.



Contents lists available at ScienceDirect

## Experimental Parasitology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/yexpr](http://www.elsevier.com/locate/yexpr)

Full length article

## *In vivo* and *in vitro* effects of the herbicide Roundup® on developmental stages of the trematode *Echinostoma paraensei*



Tainá C. de C. Monte <sup>a</sup>, Juberlan Garcia <sup>a</sup>, Rosana Gentile <sup>a</sup>,  
Maurício Carvalho de Vasconcellos <sup>b</sup>, Joyce Souza <sup>a</sup>, Brunna V. Braga <sup>a</sup>,  
Arnaldo Maldonado Jr. <sup>a,\*</sup>

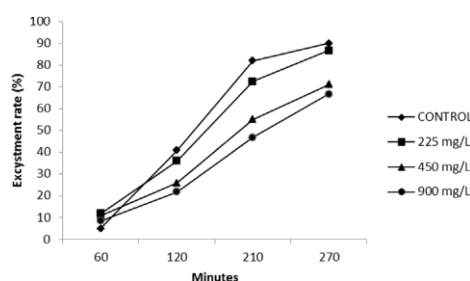
<sup>a</sup> Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Avenida Brasil 4365, Mangunhos, CEP 21040-360, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>b</sup> Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

### h i g h l i g h t s

- All developmental stages of the trematode *Echinostoma paraensei* are affected by RoundUp® exposure under experimental conditions.
- The mortality of specimens was concentration-dependent as well as the excystment rate of metacercariae.
- The trematode *E. paraensei* is a good model organism to test pesticides regarding human and environmental health.

### g r a p h i c a l a b s t r a c t



### a r t i c l e i n f o

#### Article history:

Received 5 April 2016

Received in revised form

10 June 2016

Accepted 29 June 2016

Available online 1 July 2016

#### Keywords:

Mortality

Trematode

Developmental stages

Herbicide

Experimental assays

### a b s t r a c t

The exposure of wildlife and humans to toxic residues of Roundup® through agricultural practices or the food chain has been reported since the herbicide was found contaminating rivers. Glyphosate, *N*-(phosphonomethyl)glycine acid, is a nonselective post-emergent herbicide and is formulated as an isopropylamine salt with the surfactant taloamine polyethoxylate (POEA) representing the commercial formulation of Roundup®. There is little knowledge about the effects of the herbicide on helminth parasites, particularly those whose life cycle is related to water bodies. Here we investigated the effects of the Roundup® on the food-borne trematode *Echinostoma paraensei* in experimental conditions using different developmental stages (eggs, miracidia, cercariae, metacercariae, newly excysted larvae (NEL), helminths at seven days and helminths at fourteen days). Three different herbicide concentrations were tested based on concentrations typically applied in the field: 225, 450 and 900 mg/L. Specimens were analyzed *in vitro* for hatching miracidia, mortality and excystment rate of metacercariae and *in vivo* for parasitic load and egg production. There was a significant difference in the hatching miracidia rate only for the newly embryonated eggs. The mortality of specimens and excystment rate of metacercariae were concentration-dependent. There was a significant difference in the miracidia mortality with respect to concentration until 56.3 mg/L. The same effect was observed for cercariae, and mortality was observed from 15 min onwards at concentrations of 225–900 mg/L. At low concentrations, mortality was detected after 30 min. The effects of the herbicide concentration on NEL and on helminths at seven and fourteen days showed a significant difference after 24 h. There was no significant difference in parasitic load and egg production after infection of rodents with exposed metacercariae. All developmental stages of the trematode *E. paraensei* were affected by Roundup® exposure under experimental conditions. These

\* Corresponding author.

E-mail address: [maldonad@ioc.fiocruz.br](mailto:maldonad@ioc.fiocruz.br) (A. Maldonado). <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2016.06.012>

results suggest that dynamics of transmission of the trematode could be affected in the natural environments. The study also reinforces the usefulness of this trematode as a good model organism to test pesticides regarding human and environmental health.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

The use of pesticides in agriculture is a matter of concern due to their impact on environmental and human health, since they can contaminate water, soil and food, particularly due to the persistence of their residues in the environment and extensive use (Solomon et al., 1996). Among conventional herbicides, the most marketed worldwide and best-selling in Brazil is glyphosate (ANVISA; UFPR, 2012; IBAMA, 2010). Since 2008, Brazil has been the world's largest consumer of pesticides, and herbicides are the most commonly used class among them (Carneiro et al., 2012).

Glyphosate, *N*-(phosphonomethyl)glycine acid is a nonselective, post-emergent herbicide that acts on the enzyme system of plants, inhibiting the essential pathway of shikimic acid, which is involved on the metabolism of amino acids (Amarante et al., 2002; Schonbrunn et al., 2001). In Brazil, glyphosate is formulated as an isopropylamine salt and along with the surfactant taloamine polyethoxylate (POEA) (Lancôt et al., 2014; Navarro-Martín et al., 2014) if composes the commercial formulation Roundup®.

The exposure of wildlife and humans to residues of Roundup® through agricultural practices or the food chain has been reported, since the herbicide was found contaminating rivers (Acquavella et al., 2004; Takahashi et al., 2001). *In vivo* studies employing snails, fish, amphibians and rats (Cattani et al., 2014; Hock and Poulin, 2012; Lancôt et al., 2014; Lushchark et al., 2009; Navarro-Martín et al., 2014), and *in vitro* studies with human and animal cells (Benachour et al., 2007; Clair et al., 2012), have been conducted to evaluate the toxicity of this herbicide.

There is little knowledge about the effects of the pesticides on helminth parasites, particularly those whose life cycle is related to water bodies. *Echinostoma paraensei* Lie and Basch, 1967 is an intestinal trematode that was isolated from infected *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 snails from Minas Gerais state, Brazil (Lie and Basch, 1967). Its natural definitive host is the semi-aquatic rodent *Nectomys squamipes* (Maldonado et al., 2001a), which has wide geographical distribution along the Atlantic Forest biome in Brazil (Bonvicino et al., 2008). This helminth has been used as a model organism to elucidate various aspects of host-parasite relationship (Garcia et al., 2011, 2012; Maldonado et al., 2001a; Maldonado et al., 2001b; Pinheiro et al., 2009). More recently, the use of *in vitro* assays with *E. paraensei* proved promising to shed light on the processes involved in the phenomenon of metacercariae excystment (Souza et al., 2013). This trematode was also used as an *in vivo* model to screen drugs already commercially available, with anthelmintic potential, and to clarify the action mechanisms and morphological changes resulting from its use (Ferraz et al., 2012; Gonçalves et al., 2013).

During the adult stage, *E. paraensei* inhabits the small intestine of the definitive host, which eliminates immature eggs with its feces. When finding appropriate environmental conditions, such as in streams and freshwater bodies, this parasite develops a ciliated miracidial stage that hatches from the egg and actively infects the intermediate snail host. Under experimental conditions, it can infect snails of the genus *Biomphalaria* spp., *Physa marmorata* or *Lymnaea collumela* (Maldonado et al., 2001b; Maldonado and Lanfredi, 2009; Pinheiro et al., 2009). Within the gastropod snail,

the miracidia undergo asexual reproduction and produce the stages of sporocyst, redia and cercariae. The cercariae released from snails reach the aquatic environment and encyst in a second intermediate host (snails, amphibians, fish or crustaceans) as metacercariae, which is the infective form to definitive host (Esteban and Munoz-Antoli, 2009). The definitive host becomes infected by ingesting the second infected intermediate hosts harboring metacercariae, which excyst in the gastrointestinal tract and attach to the duodenal mucosa with the aid of body suckers (Fried and Huffman, 1996).

In this study, we used the developmental stages of the trematode *E. paraensei* (miracidia, cercariae, metacercariae, newly excysted larvae, helminths at seven days and helminths at fourteen days) as a model to evaluate the mortality and behavior alterations of this helminth caused by exposure to Roundup® *in vivo* and *in vitro*.

## 2. Material and methods

### 2.1. *Echinostoma paraensei* isolate

The *E. paraensei* isolate utilized was obtained from wild rodents, *N. squamipes*, naturally infected, collected in the municipality of Sumidouro, Rio de Janeiro state (22° 02' 46" S, 42° 41' 21" W) (Maldonado et al., 2001a). The life cycle of *E. paraensei* is regularly maintained in the Laboratory of Biology and Parasitology of Wild Mammal Reservoirs (Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, Brazil) through passages in *Mesocricetus auratus* (hamsters) and *B. glabrata* as definitive and intermediate hosts, respectively (Garcia et al., 2011). All experiments were conducted in accordance to the rules of the Oswaldo Cruz Foundation's ethical committee on animal use (Permit: LW-51/14).

#### 2.1.1. Miracidia and cercariae stages

Uterine eggs were recovered from adult worms at the third week of infection in hamsters and incubated in dechlorinated water at 26 °C for 14 days in darkness. After this period, the eggs were exposed to light under a 100 W incandescent lamp to stimulate miracidia hatching. *B. glabrata* specimens were individually infected with 10 miracidia and after 26 days, exposed to artificial light to induce cercarial emergence (Garcia et al., 2011).

#### 2.1.2. Obtaining newly excysted larvae (NEL)

In order to obtain NEL through *in vitro* excystment, metacercarial cysts were recovered by dissection of the pericardium region of *B. glabrata* experimentally infected by *E. paraensei* under a stereomicroscope. Metacercariae were placed in alkaline trypsin bile salts medium (TB medium) containing 0.5% trypsin (1:250, pig pancreas, GIBCO) plus 0.5% bile salts (Sigma-Aldrich) with Earle's balanced salt solution (Earle's BSS) (6.8 g/L NaCl; 0.4 g/L KCl; 0.2 g/L, CaCl<sub>2</sub>; 0.1 g/L MgSO<sub>4</sub>; 0.125 g/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O; 2.2 g/L NaHCO<sub>3</sub>; 1 g/L D-glycose) at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>, according to Souza et al. (2013).

#### 2.1.3. Experimental infection of rodents

For *in vitro* analysis, four female hamsters, aged three weeks, were infected with metacercariae collected from snails (*B. glabrata*) experimentally infected by *E. paraensei*, to obtain helminths with

ages of seven and fourteen days post-infection. Each animal was infected by gavage with 50 metacercariae of *E. paraensei*. The hamsters received commercial pellet food (Nuvilab) and water *ad libitum* and were maintained under a 12-h light/dark cycle, at 22 °C and 50% humidity. Two animals were euthanized in each period (seven and fourteen days, respectively) after being anesthetized using ketamine (5 mg/kg, body weight) and xylazine (0.5 mg/100 g, body weight) and were subsequently necropsied using a CO<sub>2</sub> chamber, to recover the helminths from the small intestine (Ferraz et al., 2012).

*In vivo* effects of the Roundup® were evaluated on the parasitic load and egg production of *E. paraensei*, using different herbicide concentrations. Twelve female hamsters, three-weeks of age, were infected by gavage with 30 metacercariae of *E. paraensei* after herbicide exposure (as described in item 2.2.4). The animals were euthanized and necropsied 21 days after infection as described above.

## 2.2. Exposure to Roundup®

### 2.2.1. Concentrations used in the experiments

The pesticide used was Roundup® Original (480 g/L isopropylamine salt *N*-(phosphonomethyl) glycine; 360 g/L equivalent acid *N*-(phosphonomethyl)glycine; 684 g/L inert ingredients) produced by Monsanto, USA. Successive dilutions of the herbicide (3600 mg/L - 0 mg/L) in RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) supplemented with 100 U/ml penicillin, 100 mg/L streptomycin, 0.25 mg/mL amphotericin and 20% fetal bovine serum, were prepared to determine the median lethal concentration (LC<sub>50</sub>) and to select the test concentrations.

### 2.2.2. *In vitro* effects on hatching *E. paraensei* miracidia

Uterine eggs were recovered from helminths with 21 days post infection. The effects on the hatching miracidia were evaluated at three different embryonic periods: newly embryonated eggs (day 0), developing miracidia (day 7) and fully developed miracidia (day 10) (Idris and Fried, 1996). Ninety eggs of each developmental period were exposed for 24 h to three Roundup® concentrations (225, 450 or 900 mg/L) obtained by serial dilutions with dechlorinated water, or with dechlorinated water alone for the control group. After this time, the eggs were removed from Roundup® and washed three times in dechlorinated water. On the 14th day after initial incubation at 26 °C in darkness, the eggs were exposed to light incandescent lamp (100 W) for four hours to stimulate miracidia hatching. The hatched eggs were scored under a stereoscopic microscope (Zeiss Stemi SV6) (Maldonado et al., 2011b; Raffel et al., 2009). The assays were performed in triplicate.

### 2.2.3. *In vitro* culture and mortality

For *in vitro* mortality, we used 120 NEL, 40 helminths with seven days and 40 helminths with fourteen days. The NEL and adult forms were washed twice in Locke's solution and transferred to the supplemented RPMI 1640 culture medium containing one of three Roundup® concentrations (225, 450 or 900 mg/L) at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> (Panic et al., 2013). A control group was exposed to the culture medium without Roundup® under the same conditions.

The specimens were scored for mortality after 2, 3, 4, 6, 12 and 24 h. Live specimens were assessed through mechanical stimulation with the aid of a needle and by the method of exclusion of the vital dye trypan blue at 0.5% (0.5 g trypan blue; 100 mL saline solution) under a stereoscopic microscope (Zeiss Stemi SV6) (Panic et al., 2013). The assays were performed in duplicate.

Thirty miracidia and 30 cercariae were placed in a 24-well plate (ten specimens in each well) with different Roundup® concentrations, ranging from 3.6 to 900 mg/L obtained by serial dilutions

with dechlorinated water, or with dechlorinated water alone for the control group. The mortality of the specimens was analyzed at different intervals (15, 30, 60, 90, 120, 150 and 180 min) under a stereoscopic microscope (Zeiss Stemi SV6) (Raffel et al., 2009). The assays were performed in triplicate.

### 2.2.4. Excystment rate of metacercariae

In order to evaluate the effects on excystment of *E. paraensei* metacercariae, the metacercarial cysts were transferred to Locke's solution containing 225, 450 or 900 mg/L of Roundup® or to the Locke's solution alone for the control group for two hours at room temperature. After this period, the metacercariae were transferred to TB medium to carry out *in vitro* excystment, as described above (Souza et al., 2013). The excystment process was evaluated at 60, 120, 210 and 270 min. The assays were performed in duplicate.

As an additional experiment, 90 metacercariae of the 900 mg/L group that did not show excystment after 270 min, were removed from TB medium and washed in Locke's solution for subsequent infection of three rodents (30 metacercariae per rodent), to observe if the effects of the pesticide is reversible *in vivo*. Adult helminths were recovered from hamsters at 21 days post-infection by dissection of the small intestine, as described in item 2.1.3.

### 2.2.5. Helminth parasitic load and egg production

Thirty metacercariae were previously exposed to 225, 450 or 900 mg/L of Roundup® or to Locke's solution alone (control group) for two hours at room temperature, before the infection of the rodents. Adult helminths were recovered from hamsters at 21 days post-infection by dissection of the small intestine. The number of adult worms was recorded for each concentration. Uterine eggs recovered from six randomly chosen worms were used to determine the egg production per individual for each Roundup® concentration, following Maldonado et al. (2001b).

## 2.3. Statistical analysis

One-way analysis of variance (ANOVA) was used to determine differences among concentrations on parasitic load and production of eggs. Two-way analysis of variance (ANOVA 2 way) was used to identify differences on the excystment rate of metacercariae, according to concentrations and through time. The Tukey test was performed post-hoc in order to indicate significant differences. T test was used to investigate the excystment rate within each period among concentrations. The Kruskal-Wallis test was used to determine differences on mortality of miracidia and cercariae, according to concentrations and time interval, since the data were not normally distributed. In these cases, the Mann-Whitney post-hoc test was applied to indicate significant differences, using concentrations up to 56.3 mg/L for miracidia and up to 225 mg/L for cercariae. Fisher exact tests were used to investigate differences in hatching miracidia rate among concentrations within each embryonic period (newly embryonated eggs, developing miracidia and fully developed miracidia).

Comparisons of the mortality rates among different developmental stages (NEL, helminths at seven days and at fourteen days) and among different Roundup® concentrations were performed using Generalized Linear Models (GLM), in which the best model was chosen using the Akaike Information Criteria corrected for finite samples (AICc).

All data were tested for normal distribution using the Shapiro-Wilk test. The analyses were carried out using PAST v3.08 (Hammer et al., 2001), except for the GLM analyses which were performed using SPSS version 21. Values with  $P < 0.05$  were considered significant.



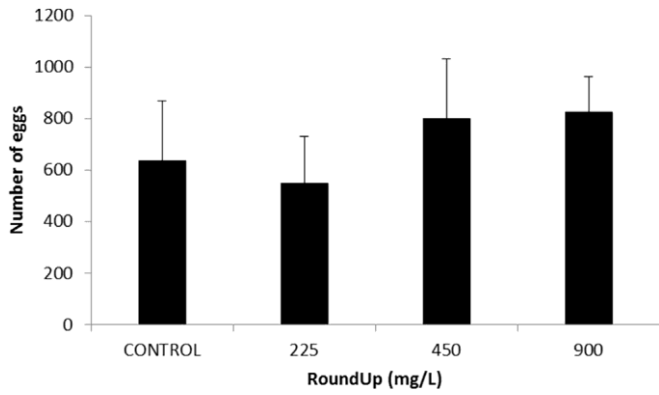


Fig. 1. Mean number of *E. paraensei* eggs and standard deviations recovered 21 days after infection of *Mesocricetus auratus* with 30 metacercariae previously exposed for two hours to different concentrations of Roundup®.

### 3. Results

#### 3.1. Parasitic load and egg production in vivo

The means ± SDs (standard deviations) of parasitic loads recovered from infected rodents were 16.7 ± 4.5; 14.7 ± 4.5; 15.5 ± 2.1 and 15.7 ± 3.5, referring to control, 225, 450 and 900 mg/L groups, respectively. There was no significant difference among concentrations (parasitic load: F ¼ 0.690; P ¼ 0.583; df ¼ 3) as well as in the number of eggs produced (egg production: F ¼ 2.78; P ¼ 0.067; df ¼ 3) (Fig. 1).

#### 3.2. Excystment rate of E. paraensei metacercariae

The excystment rate of metacercarial cysts was influenced by the concentration of herbicide, showing significant difference among groups (F ¼ 5.74; P ¼ 0.01; df ¼ 3) as well as among the period of time for excystment (F ¼ 72.4; P ¼ 1.272E-06; df ¼ 3). The Tukey test showed significant differences in the total excystment rate between the control group and the 900 mg/L group (P ¼ 0.02), and between the 225 mg/L group and the 900 mg/L group (P ¼ 0.05). Significant differences were observed among all periods of excystment within each group (P < 0.05), except between 210 and 270 min (Fig. 2). The excystment rate within each period did not show significant differences among the concentration groups in any case (P ¼ 1).

The encysted metacercariae showed weak activated stage with slow movements at all herbicide concentrations, leading to a delay

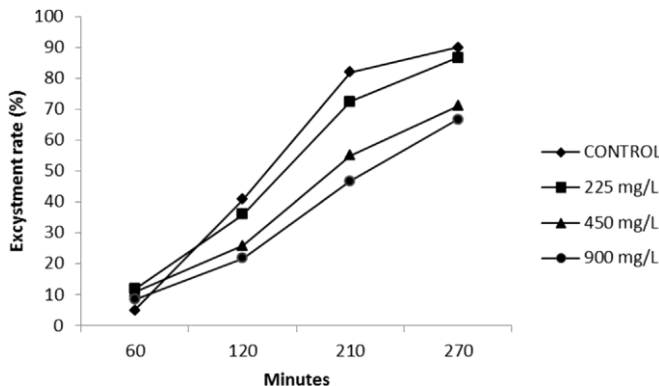


Fig. 2. Excystment rate (%) of *Echinostoma paraensei* metacercariae in vitro (n 60) previously exposed to different concentrations of Roundup® (mg/L) over time.

Table 1  
Hatching miracidia rate (%) of *Echinostoma paraensei* in vitro (n 90) after 24 h of exposure to different concentrations of Roundup® in different embryonic periods.

Group	Hatching miracidia (%)			
	Control	225	450	900
Roundup® (mg/L)				
Embryonic period				
Newly embryonated eggs	13.3	4.4	3.3	1.1
Developing miracidia	7.7	10	6.6	8.8
Fully developed miracidia	13.3	7.7	12.2	5.6

in the excystment process. We observed a 97% reduction in parasitic load recovered from rodents infected with metacercariae which did not excyst in vitro at 900 mg/L.

#### 3.3. In vitro hatching miracidia rate

When comparing the hatching miracidia rate among concentrations within each embryonic period, we found significant difference between the control group and the concentrations only for the newly embryonated eggs (day 0), in which we observed a reduction in the number of hatching miracidia from the lowest concentration (P ¼ 0.041) (developing miracidia (day 7): P ¼ 0.983; fully developed miracidia (day 10): P ¼ 0.535) (Table 1).

#### 3.4. In vitro mortality assay

There was a significant difference in the miracidia mortality among the concentration groups until 56.3 mg/L. We observed 100% mortality from 112.5 mg/L group onwards (miracidia: Hc ¼ 25.84; P ¼ 9.596E-05). The same effect was observed for cercariae (cercariae: Hc ¼ 3.05; P ¼ 3.267E-07), and mortality was observed from 15 min of exposure at concentrations of 225–900 mg/L. At concentrations ranging from 28.2 to 112.5 mg/L, mortality was detected after 30 min (Tables 2 and 3). The miracidia showed greater sensitivity than the cercariae to the herbicide.

The mortality rates of miracidia and cercariae stages under different concentrations showed no significant difference according to time of exposure (miracidia: Hc ¼ 10.5; P ¼ 0.105) (cercariae: Hc ¼ 1.892; P ¼ 0.435). However, significant pairwise differences in mortality rates were observed between 15 min of exposure and 120, 150 and 180 min for miracidia (U 5, P ¼ 0.0416; U 4, P ¼ 0.027; U ¼ 4, P ¼ 0.027, respectively).

At 180 min, the miracidia that remained alive showed slow movements. Most specimens of cercariae lost the tail when exposed to higher herbicide concentrations. At lower concentrations, the cercariae apparently presented similar movements to the control group.

Concerning the effects of the herbicide concentration on NEL, and on helminths with seven and fourteen days, the results showed

Table 2  
Mortality (%) of miracidia of *Echinostoma paraensei* in vitro (n 30) after 180 min of exposure to different concentrations of Roundup®.

Group	Miracidia					
	Control	3.6	7.1	14.1	28.2	56.3
Roundup® (mg/L)						
Exposure time (minutes)						
15	0	0	10	0	0	70
30	0	0	10	10	66.7	100
60	0	13.8	32.2	18.5	83.3	100
90	0	25.4	43.2	32.7	91.7	100
120	3.6	39.2	52.8	68.8	95	100
150	3.6	47.1	57.8	81.9	100	100
180	3.6	50.9	66	100	100	100



Table 3  
*In vitro* Mortality (%) of cercariae of *Echinostoma paraensei* (n = 30) after 180 min of exposure to different concentrations of Roundup®.

Group	Cercariae									
	Control	3.6	7.1	14.1	28.2	56.3	112.5	225	450	900
Roundup® (mg/L)										
Exposure time (minutes)										
15	0	0	0	0	0	0	0	74.8	86.7	100
30	0	0	0	0	1.8	50	26.8	95	100	100
60	0	0	0	1.7	31.7	50	72.3	100	100	100
90	0	0	0	1.7	39.3	65	96.5	100	100	100
120	0	0	0	1.7	48.2	65	100	100	100	100
150	0	0	0	1.7	50	70	100	100	100	100
180	0	0	0	1.7	63.4	80	100	100	100	100

a significant difference at 24 h after exposure for all stages (NEL: Hc ¼ 20.63, P ¼ 0.0001) (seven days: Hc ¼ 21.79, P ¼ 7.203E-05) (fourteen days: Hc¼14.68, P¼0.0021). However, when comparing the mortality rates through time for all three development stages, we found no significant difference (NEL: Hc 1.1, P¼0.954) (seven days: Hc ¼ 98.1, P ¼ 0.998) (fourteen days: Hc ¼ 4.49, P ¼ 0.480) (Table 4).

The best model obtained in the GLM test indicated that mortality rates of the NEL, seven day and fourteen day helminths were concentration dependent (Table 5).

#### 4. Discussion

In the present study, different development stages of the life cycle of the trematode *E. paraensei* were exposed to the herbicide Roundup® *in vitro* and *in vivo* to assess the effects on the helminth mortality and their behavior. Concentration dependent mortality was observed in the different development stages of the parasite. Several studies have been conducted with pesticides, including glyphosate and Roundup®, to verify the effects on non-target organisms, such as fish (Gluszcak et al., 2007; Langiano and Martinez, 2008), snails (Hock and Poulin, 2012; Bakry et al., 2015), amphibians (Dornelles and Oliveira, 2014) and mammals (El-Shenawy, 2009).

The eggs of *E. paraensei* are oval, operculate and released embryonated in the feces of definitive host in the environment. These newly embryonated eggs have only yolk globules and embryo which is not developed until reach appropriate environmental conditions (Idris and Fried, 1996). These eggs could be exposed to environmental pollutants, such as pesticides, which could affect the development of the miracidia larval stage. In the present study, we observed the effects of 24 h of exposure to herbicide Roundup® on hatching miracidia only those newly embryonated eggs. This evidenced that herbicide may interfere with the proper development of miracidia, reducing its hatching rate in natural conditions. These results differing from those performed by Raffel et al. (2009), using

only the active ingredient, glyphosate, on eggs and miracidia of *Echinostoma trivolvis*. Maldonado et al. (2001b) showed *E. paraensei* miracidial movements by 6 days of development, suggesting that 7 and 10-day old eggs when exposed to different concentrations of Roundup® would not be so affected, since they were already in a more advanced stage of development.

Direct adverse effects on free-living stages of trematodes have not been thoroughly investigated, with inconclusive results about the sensitivity of miracidia and cercariae to contaminants. Raffel et al. (2009) showed no evidence of significant biological effects (hatching success and miracidia survival) of glyphosate at ecologically relevant concentrations on embryos and miracidia of *E. trivolvis*. In a previous study, Rohr et al. (2008) exposed cercariae of *E. trivolvis* to different pesticides, including glyphosate, and showed that these pesticides caused significantly greater mortality of cercariae than control treatments, but only atrazine significantly reduced cercarial survival. Although in both studies the time of exposure was 24 h, the authors only use of the active ingredient in low concentrations. In the present study, the tested herbicide Roundup® has other components besides glyphosate, which may explain the effects observed.

In contrast, our data showed that miracidia had a higher percentage of mortality to Roundup® than cercariae, using the same concentrations. This may be due to inert ingredients present in commercial formulations, such as the surfactant POEA, which acts as cell membrane disruptors and amplify toxicity induced by the active ingredient, as demonstrated in cell culture (Marc et al., 2002; Benachour and Seralini, 2009). Moreover, the cercariae are covered by glycocalyx that sits upon the tegument that is constituted by a trilaminar membrane system which may act as physical barrier to Roundup® (Dorsey et al., 2002) while miracidia have epidermal plates with interepidermal spaces, which may facilitate the herbicide's penetration (Pinheiro et al., 2004) and therefore been more sensitive. The cercarial stage of trematodes is dependent on a glycogen store for energy metabolism. Morley et al. (2003) suggested that the inhibition of enzymes related to metabolism is

Table 4  
*In vitro* Mortality (%) of newly excysted larvae (NEL) (n = 120) and helminths recovered after 7 (n = 40) and 14 days (n = 40) of infection in *Mesocricetus auratus* (hamster) after exposure to varying concentrations of Roundup® at different time intervals.

Helminth age	Groups											
	NEL				7 days				14 days			
	C	225	450	900	C	225	450	900	C	225	450	900
Roundup® (mg/L)												
Exposure time (hours)												
2	0	0	50	70.8	0	0	50	70	0	0	0	0
3	0	0	50.8	100	0	0	50	100	0	0	32.5	50
4	0	0	50.8	100	0	0	58.4	100	0	0	50	50
6	0	0	54.1	100	0	0	58.4	100	0	0	50	50
12	0	0	100	100	0	0	60.4	100	0	0	50	50
24	0	12.5	100	100	0	14	66.7	100	0	20	50	60

C ¼ control.

Table 5

Models tested for comparisons of the mortality rates among different development stages of *Echinostoma paraensei* (NEL, helminths with seven and fourteen days) and among different Roundup® concentrations using Generalized Linear Models (GLM). The best model was chosen using the Akaike Information Criteria.

Model	AICc	D AICc	w AICc
Concentration	114.384	0	1
Concentration þ Development stage	122.869	8.485	0
Null	127.469	13.085	0
Development stage	135.274	20.89	0

involved in alterations in cercarial survival when exposed to contaminants. Some authors suggested that pesticide toxicity were associated with inhibition of enzymatic function in miracidia survival of *Fasciola hepatica*, which could influence respiration and utilization of glycogen, altering the life span (Bonieka and Guttowa, 1975; Moczon, 1976a,b).

The cercarial tail plays a crucial role in the life span of the cercariae, and when close to death they shed their tail to reduce energy demand suggesting that cercarial activity is the major factor in cercarial tail loss (Morley et al., 2002, 2005). In the present study, the cercarial tail loss can be considered a first stage of mortality induced by Roundup®, suggesting that the herbicide influences the energy metabolism of these larval stages affecting the success of cercarial transmission. Besides that, the observed progressive decrease of cercarial swimming and then death, can also be explained by the presence of sensory receptors and neurons in the body of the cercariae that may have been affected by Roundup® at some point, consequently affecting their neuromuscular system (Sebelová et al., 2004; Tolstenkov et al., 2012).

The metacercariae are characterized by having a protective multilayered wall. High tolerance to toxic substances in the environment by metacercariae is expected, even with direct exposure, since they are protected by the cyst wall. Some studies have suggested that metacercariae are not directly exposed to the toxicant inside the host, but only to the contaminants that accumulate in adjacent tissues (Siddall, 1992; Morley et al., 2003; Chlopecka et al., 2014). Previous *in vitro* studies related to encystment of *Echinostoma revolutum* cercariae showed that encystment occurred in snail mucus, with the cysts showing normal features (Fried and Bennett, 1979) and also to *E. paraensei*, encystment occurred in the presence of snail embryo cells in culture (Stein and Basch, 1977). These findings highlight the importance of analyzing the effect of the Roundup® in metacercariae, which although usually encystment occurs within the host, ectopic encystment may occur.

Moreover, studies with *Fasciola gigantica* metacercarial cysts showed inhibition of infectivity to the definitive host when chronically exposed to silage waste (Gupta and Kamra, 1987). In addition, the exposure to toxic substances, such as fertilizers, caused a reduction in *F. hepatica* establishment, probably due to the increase in mortality of metacercariae (Brglez and Wikehauser, 1968). In contrast, in a study of the influence of metals toxicity on infectivity of chronically exposed *Notocotylus attenuatus* metacercariae, Evans (1982) found no significant reduction in the parasitic load recovered from control or metal-exposed metacercariae. In the present study, there was acute exposure of metacercariae to different Roundup® concentrations, which might explain the similar parasitic load recovered from the definitive host among the groups with different herbicide concentrations.

Morley et al. (2001) carried out *in vitro* excystment studies with *Parorchis acanthus* metacercariae to evaluate changes in excystment rate after exposure to toxic heavy metals. The authors noted a fluctuation in the excystment rate, which was attributed to an alteration in the structural integrity of the layers in exposed cysts. Subsequently, Bennett et al. (2003) showed significantly reduced

excystment with higher concentrations of pesticide when evaluating the effects of Tributyltin and heavy metals on *in vitro* excystment of metacercariae of the same trematode. The percentage of metacercariae excysted decreased with increasing pesticide concentration. These findings are in agreement with ours, which show a decrease in excystment rate with increasing herbicide concentration. This may be related to penetration of Roundup® through the cyst by lamellar cystic wall layers, interfering with the metabolism and influencing the excystment process, both *in vitro* and *in vivo*.

Few studies with pesticides have been conducted with adult stages of helminths focusing on free-living stages of trematodes (Raffel et al., 2009; Rohr et al., 2008). We evaluated the *in vitro* mortality of NEL as well as adult helminths, which presented concentration-dependent mortality. The active ingredient, glyphosate, is less toxic than the surfactant POEA, which is considered an inert ingredient present in the commercial formulations. Nevertheless, the toxicity of this surfactant has been demonstrated in different organisms (Adam et al., 1997; Tsui and Chu, 2003). In toxicity studies with human cells culture using POEA, Mesnage et al. (2013) observed negative effects on cellular respiration and on membrane integrity, which were related to the necrosis mechanisms linked to the adjuvants instead of glyphosate at higher levels. Previously, Benachour and S eralini (2009) showed human cell damage caused by glyphosate and its commercial formulations, such as cell disruption and damage to mitochondrial membranes, promoting necrosis and causing total cell death, indicating that the surfactant POEA in Roundup® formulations is not inert. These results at the cellular level in metazoa may suggest possible cell damage in helminths, leading to their death.

## 5. Conclusion

In conclusion, since organisms in the environment are exposed to commercial pesticides, the analysis of those products is necessary to elucidate their toxic effects. In the present work, we observed that all developmental stages of the trematode *E. paraensei* is affected by Roundup® exposure under experimental conditions, suggesting that dynamics of transmission of the trematode could be affected in natural environment and reinforcing the usefulness of this trematode as a good model organism to test pesticides regarding human and environmental health. The presence of adjuvants can enhance toxicity to the parasite, although further studies with the active ingredient (glyphosate) and the surfactant (POEA) separately are necessary to corroborate this hypothesis.

## Acknowledgements

We would like to thank Funda ao de Amparo   Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ APQ1 111.205/2014), Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq 400061/2013-9) and Vice-Presid ncia de Ensino, Informa ao e Comunica ao of Instituto Oswaldo Cruz for financial support.

## References

- Acquavella, J.F., Alexander, B.H., Mandel, J.S., Gustin, C., Baker, B., Chapman, P., Bleeke, M., 2004. Glyphosate biomonitoring for farmers and their families: results from the farm family exposure study. *Environ. Health Perspect.* 112, 321–326.
- Adam, A., Marzuki, A., Abdul Rahman, H., Abdul Aziz, M., 1997. The oral and intratracheal toxicities of Roundup® and its components to rats. *Veterinary Hum. Toxicol.* 39, 147–151.
- ANVISA, UFPR, 2012. Semin rio de mercado de agrot xico e regula ao. ANVISA, Bras lia. Acesso em: 11 de Abril de 2012.
- Amarante Jr., O.P., Santos, T.C.R., Brito, N.M., 2002. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legisla ao. *Quimica Nova* 25, 589–593.

- Bakry, F.A., Ismail, S.M., Abd El-Atti, M.S., 2015. Glyphosate herbicide induces genotoxic effect and physiological disturbances in *Bulinus truncatus* snails. *Pestic. Biochem. Physiol.* 123, 24–30.
- Benachour, N., Sipahutar, H., Moslemi, S., Gasnier, C., Travert, C., Seralini, G.E., 2007. Time- and dose- dependent effects of Roundup® on human embryonic and placental cells. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 53, 126–133.
- Benachour, N., Seralini, G.E., 2009. Glyphosate formulations induce apoptosis and necrosis in human umbilical, embryonic and placental cells. *Chem. Res. Toxicol.* 22, 97–105.
- Bennett, S.C., Irwin, S.W.B., Fitzpatrick, S.M., 2003. Tributyltin and copper effects on encystment and *in vitro* excystment of *Parorchis acanthus* larvae. *J. Helminthol.* 77, 291–296.
- Boniaka, B., Guttowa, A., 1975. The influence of pesticides on the oxygen uptake by miracidia of *Fasciola hepatica* (Trematoda). *Bull. L'Acad. Pol. Sci. Biol.* 23, 463–467.
- Bonvicino, C.R., Oliveira, J.A., D'Andrea, P.S., 2008. Guia dos roedores do Brasil, com chaves para gêneros baseados em caracteres externos. Centro Pan Americano de Febre Aftosa e OPAS/OMS, Rio de Janeiro, 120 pp.
- Brglez, J., Wikehauser, T., 1968. On the effect of some fertilizers and copper sulphate upon the survival of cercariae and metacercariae of *Fasciola hepatica*. *Wiadomości Parazytol.* 14, 675–677.
- Carneiro, F.F., Pignati, W., Rigotto, R.M., Augusto, L.G.M., Rizzolo, A., Faria, N.M.X., Alexandre, V.P., Friedrich, K., Mello, M.S.C., 2012. Dossiê ABRASCO e Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Parte 1 e Agrotóxicos. Segurança Alimentar e Nutricional e Saúde, Rio de Janeiro, 88pp.
- Cattani, D., de Liz Oliveira Cavalli, V.L., Heinz Rieg, C.E., Domingues, J.T., Dal-Cim, T., Tasca, C.I., Mena Barreto Silva, F.R., Zamoner, A., 2014. Mechanisms underlying the neurotoxicity induced by glyphosate-based herbicide in immature rats hippocampus: involvement of glutamate excitotoxicity. *Toxicology* 320, 34–45.
- Chlopecka, M., Mendel, M., Dziekan, N., Karlik, W., 2014. Glyphosate affects the spontaneous motoric activity of intestine at very low doses e *in vitro* study. *Pestic. Biochem. Physiol.* 113, 25–30.
- Clair, E., Mesnage, R., Travert, C., Seralini, G.E., 2012. A glyphosate-based herbicide induces necrosis and apoptosis in mature rat testicular cells *in vitro*, and testosterone decrease at lower levels. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* 26, 269–279.
- Dornelles, M.F., Oliveira, G.T., 2014. Effect of atrazine, glyphosate and quinclorac on biochemical parameters, lipid peroxidation and survival in bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 66, 415–429.
- Dorsey, C.H., Cousin, C.E., Lewis, F.A., Stirewalt, M.A., 2002. Ultrastructure of the *Schistosoma mansoni* cercaria. *Micron* 33, 279–323.
- El-Shenawy, N.S., 2009. Oxidative stress responses of rats exposed to Roundup® and its active ingredient glyphosate. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 28, 379–385.
- Esteban, J.G., Muñoz-Antoli, C., 2009. Echinostomes: systematics and life cycle. In: Fried, B., Toledo, R. (Eds.), *The Biology of Echinostomes from the Molecule to the Community*. Springer, New York, pp. 1–34.
- Evans, N.A., 1982. Effects of copper and zinc on the life cycle of *Notocotylus attenuatus* (Digenea: notocotylidae). *Int. J. Parasitol.* 12, 363–369.
- Ferraz, J., Souza, J., Costa-Silva, M., Torres, E., Santana, A., Lanfredi, R., Maldonado, A., Garcia, J., 2012. Effect of praziquantel on adult *Echinostoma paraensei* worms in experimentally infected mice. *Parasitol. Res.* 111, 143–148.
- Fried, B., Bennett, M.C., 1979. Studies on encystment of *Echinostoma revolutum* cercariae. *J. Parasitol.* 65, 38–40.
- Fried, B., Huffman, J.E., 1996. The biology of the intestinal trematode *Echinostoma caproni*. *Adv. Parasitol.* 38, 311–368.
- Garcia, J.S., Hooper, C.S., Simões, R.O., Santos, M.A.J., Maldonado Júnior, A., Pinheiro, J., 2011. Biochemical and histological responses of *Rattus norvegicus* (Wistar) infected by *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae). *Veterinary Parasitol.* 178, 86–92.
- Garcia, J.S., Pinheiro, J., Hooper, C.S., Simões, R.O., Maldonado Júnior, A., 2012. Haematological alterations in *Rattus norvegicus* (Wistar) experimentally infected with *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae). *Exp. Parasitol.* 131, 300–303.
- Gluszcak, L., Miron, D.S., Moraes, B.S., Simões, R.R., Schetinger, M.R.C., Morsch, V.M., Loro, V.L., 2007. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicol. Pharmacol.* 146, 519–524.
- Gonçalves, J.P., Oliveira-Menezes, A., Maldonado Júnior, A., Carvalho, T.M.U., Souza, W., 2013. Evaluation of praziquantel effects on *Echinostoma paraensei* ultrastructure. *Veterinary Parasitol.* 194, 16–25.
- Gupta, S.C., Kamra, D.N., 1987. Influence of wastelake fermentation on viability of *Fasciola gigantica* metacercariae. *Biol. Wastes* 22, 311–313.
- Hammer, O., Harper, D.A.T., Ryan, P.D., 2001. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol. Electron.* 4, 9.
- Hock, S.D., Poulin, R., 2012. Exposure of the snail *Potamopyrgus antipodarum* to herbicide boosts output and survival of parasite infective stages. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* 15, 13–18.
- IBAMA, 2010. Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil e Uma abordagem ambiental. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Brasília.
- Idris, N., Fried, B., 1996. Development, hatching, and infectivity of *Echinostoma caproni* (Trematoda) eggs, and histologic and histochemical observations on the miracidia. *Parasitol. Res.* 82, 136–142.
- Lancôt, C., Navarro-Martin, L., Robertson, C., Park, B., Jackman, P., Pauli, B.D., Trudeau, V.L., 2014. Effects of glyphosate-based herbicides on survival, development, growth and sex ratios of wood frog (*Lithobates sylvaticus*) tadpoles. II: agriculturally relevant exposures to Roundup® WeatherMax and Vision under laboratory conditions. *Aquat. Toxicol.* 154, 291–303.
- Langiano, V.C., Martinez, C.B.R., 2008. Toxicity and effects of glyphosate-based herbicide on Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicol. Pharmacol.* 147, 222–231.
- Lie, K.J., Basch, P.F., 1967. The life history of *Echinostoma paraensei* sp. n. (Trematoda: Echinostomatidae). *J. Parasitol.* 53, 1192–1199.
- Lushchark, O.V., Kubrak, O.I., Storey, J.M., Storey, K.B., Lushchark, V.I., 2009. Low toxic herbicide Roundup® induces mild oxidative stress in goldfish tissues. *Chemosphere* 76, 932–937.
- Maldonado Jr., A., Loker, E.S., Morgan, J.A., Rey, L., Lanfredi, R.M., 2001a. Description of the adult worms of a new Brazilian isolate of *Echinostoma paraensei* (Platyhelminthes: Digenea) from its natural vertebrate host *Nectomys squamipes* by light and scanning electron microscopy and molecular analysis. *Parasitol. Res.* 87, 840–848.
- Maldonado Jr., A., Vieira, G.O., Garcia, J.S., Rey, L., Lanfredi, R.M., 2001b. Biological aspects of a new isolate of *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae): susceptibility of sympatric snails and the natural vertebrate host. *Parasitol. Res.* 87, 853–859.
- Maldonado Jr., A., Lanfredi, R.M., 2009. Echinostomes in the wild. In: Toledo, R., Fried, B. (Eds.), *The Biology of Echinostomes from the Molecule to the Community*. Springer, New York, pp. 129–145.
- Marc, J., Mulner-Lorillon, O., Boulben, S., Hureau, D., Durand, G., Bellé, R., 2002. Pesticide RoundUp provokes cell division dysfunction at the level of CDK1/cyclin B activation. *Chem. Res. Toxicol.* 15, 326–331.
- Mesnage, R., Bernay, B., Seralini, G.-E., 2013. Ethoxylated adjuvants of glyphosate-based herbicides are active principles of human cell toxicity. *Toxicology* 313, 122–128.
- Moczon, T., 1976a. Influence of pesticides on the activities of some oxidoreductases in the miracidia of *Fasciola hepatica*. *Histochemical data. Bull. L'Acad. Pol. Sci. Biol.* 24, 227–231.
- Moczon, T., 1976b. Inhibitory effect of pesticides on phosphatase, glucosidase and acetylcholinesterase activity in miracidia of *Fasciola hepatica*. *Histochemical data. Bull. L'Acad. Pol. Sci. Biol.* 24, 289–292.
- Morley, N.J., Crane, M., Lewis, J.W., 2001. Toxicity of cadmium and zinc to encystment and *in vitro* excystment of *Parorchis acanthus* (Digenea: Philophthalmidae). *Parasitology* 122, 75–79.
- Morley, N.J., Crane, M., Lewis, J.W., 2002. Toxicity of cadmium and zinc to cercarial tail loss in *Diplostomum spathaceum* (Trematoda: Diplostomidae). *Parasitology* 125, 293–301.
- Morley, N.J., Irwin, S.W.B., Lewis, J.W., 2003. Pollution toxicity to the transmission of larval digeneans through their molluscan hosts. *Parasitology* 126, S5–S26.
- Morley, N.J., Crane, M., Lewis, J.W., 2005. Toxicity of cadmium and zinc mixtures to cercarial tail loss in *Diplostomum spathaceum* (Trematoda: Diplostomidae). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 60, 53–60.
- Navarro-Martin, L., Lancôt, C., Jackman, P., Park, B.J., Doe, K., Pauli, B.D., Trudeau, V.L., 2014. Effects of glyphosate-based herbicides on survival, development, growth and sex ratios of wood frog (*Lithobates sylvaticus*) tadpoles. I: chronic laboratory exposures to VisionMax. *Aquat. Toxicol.* 154, 278–290.
- Panic, G., Ingram, K., Keiser, J., 2013. Development of an *in vitro* drug sensitivity assay based on newly excysted larvae of *Echinostoma caproni*. *Parasites Vectors* 6, 237.
- Pinheiro, J., Maldonado, A., Lanfredi, R.M., 2004. Light and scanning electron microscopy of the miracidium of *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae). *Veterinary Parasitol.* 121, 265–275.
- Pinheiro, J., Maldonado Júnior, A., Lanfredi, R.M., 2009. Physiological changes in *Lymnaea columella* (Say, 1817) (Mollusca: Gastropoda) in response to *Echinostoma paraensei* Lie and Basch, 1967 (Trematoda: Echinostomatidae) infection. *Parasitol. Res.* 106, 55–59.
- Raffel, T.R., Sheingold, J.L., Rohr, J.R., 2009. Lack of pesticide toxicity to *Echinostoma trivolvis* eggs and miracidia. *J. Parasitol.* 95, 1548–1551.
- Rohr, J.R., Raffel, T.R., Sessions, S.K., Hudson, P.J., 2008. Understanding the net effects of pesticides on amphibian trematode infections. *Ecol. Appl.* 18, 1743–1753.
- Schonbrunn, E., Eschenburg, S., Shuttleworth, W.A., Schloss, J.V., Amrhein, N., Evans, J.N., Kabsch, W., 2001. Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 1376–1380.
- Sebelová, S., Stewart, M.T., Mousley, A., Fried, B., Marks, N.J., Halton, D.W., 2004. The musculature and associated innervation of adult and intramolluscan stages of *Echinostoma caproni* (Trematoda) visualised by confocal microscopy. *Parasitol. Res.* 93, 196–206.
- Siddall, R., 1992. Parasites as Biological Indicators of Sewage Sludge Dispersal. PhD thesis. University of Aberdeen.
- Solomon, K.R., Baker, D.B., Richards, R.P., Dixon, K.R., Klaine, S.J., La Point, T.W., Kendall, R.J., Weisskopf, C.P., Giddings, J.M., Giesy, J.P., 1996. Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 31–74.
- Souza, J., Garcia, J., Neves, R.H., Machado-Silva, J.R., Maldonado, A., 2013. *In vitro* excystation of *Echinostoma paraensei* (Digenea: Echinostomatidae) metacercariae assessed by light microscopy, morphometry and confocal laser scanning microscopy. *Exp. Parasitol.* 135, 701–707.
- Stein, P.C., Basch, P.F., 1977. Metacercarial cyst formation *in vitro* of *Echinostoma paraensei*. *J. Parasitol.* 63, 1031–1040.
- Takahashi, K., Horie, M., Aoba, N., 2001. Analysis of glyphosate and its metabolite,

- aminomethylphosphonic acid, in agricultural products by HPLC. *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* 42, 304–308.
- Tolstenkov, O.O., Akimova, L.N., Terenina, N.B., Gustafsson, M.K.S., 2012. The neuromuscular system in continuously swimming cercariae from Belarus. II Echinostomata, Gymnocephala and Amphistomata. *Parasitol. Res.* 111, 2301–2309.
- Tsui, M.T.K., Chu, L.M., 2003. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere* 52, 1189–1197.

## Morphological effects on helminth parasites caused by herbicide under experimental conditions

Efeitos morfológicos em helminto parasito causado por herbicida em condições experimentais

Tainá Carneiro de Castro Monte<sup>1,2</sup>; Brunna Vianna Braga<sup>2,3</sup>; Maurício Carvalho de Vasconcellos<sup>4</sup>;  
Arnon Dias Jurberg<sup>5</sup>; Ester Maria Mota<sup>6</sup>; Helene Santos Barbosa<sup>7</sup>; Juberlan Silva Garcia<sup>2</sup>;  
Arnaldo Maldonado Júnior<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Saúde, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

<sup>2</sup> Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

<sup>3</sup> Programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

<sup>4</sup> Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

<sup>5</sup> Laboratório de Pesquisas sobre o Timo, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

<sup>6</sup> Laboratório de Patologia, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

<sup>7</sup> Laboratório de Biologia Estrutural, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Received September 11, 2017

Accepted November 20, 2017

### Abstract

Helminth parasites have been studied as potential accumulators for different pollutants. *Echinostoma paraensei* is a foodborne trematode whose vertebrate host, the rodent *Nectomys squamipes*, is naturally exposed to environmental pesticides. However, little information exists regarding the pesticide's effects on helminths. This study investigated the morphological effects on the trematode, *E. paraensei*, after experimental Roundup® herbicide exposure, in concentrations below those recommended for agricultural use. After two hours of exposure, scanning electron microscopy (SEM) showed changes to the tegument, such as furrowing, shrinkage, peeling, spines loss on the peristomic collar, and histopathological evidence of altered cells in the cecum and acinus vitelline glands with vacuoles and structural changes to the muscular layers. Glycidic content was decreased, primarily in the connective tissue. As *E. paraensei* is an intestinal parasite of the semi-aquatic wild rodent, *N. squamipes*, it is predisposed to pesticide exposure resulting from agricultural practices. Therefore, we emphasize the need to evaluate its impact on helminth parasites, due to their pivotal role in regulating host populations.

**Keywords:** Experimental model, herbicide, *in vitro* assays, morphology, trematode.

### Resumo

Helmintos parasitos tem sido estudados como acumuladores potenciais para diferentes poluentes. O trematódeo *E. paraensei* tem como hospedeiro vertebrado o roedor *Nectomys squamipes* naturalmente exposto a pesticidas no meio ambiente. No entanto, pouca informação está disponível sobre os efeitos dos pesticidas em helmintos parasitos. O presente estudo investigou, em condições experimentais, os efeitos morfológicos no trematódeo *E. paraensei* após a exposição ao herbicida Roundup®, em concentrações abaixo das recomendadas para a utilização agrícola. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrou após duas horas de exposição, alterações no tegumento, como enrugamento, contração e descamação com perda de espinhos no colar peristômico e análise histopatológica evidenciou células do ceco alteradas, as glândulas vitelínicas com vacúolos e mudanças estruturais nas camadas musculares. Diminuição do conteúdo glicídico, principalmente no tecido conjuntivo, também foi observado. Considerando a predisposição à exposição a pesticidas agrícolas de *N. squamipes* infectado por *E. paraensei*, são necessários estudos para avaliar o impacto de tais resíduos frente aos helmintos e seus hospedeiros.

**Palavras-chave:** Modelo experimental, herbicida, ensaios *in vitro*, morfologia, trematódeo.



\*Corresponding author: Arnaldo Maldonado Júnior, Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Avenida Brasil, 4365, Manguinhos, CEP 21040-360, Rio de

## Introduction

Helminth parasites have been studied as potential accumulators of different pollutants resulting from modern industrial processes, particularly gastrointestinal helminths, as they acquire nutrients from their vertebrate host's intestinal lumen contents (BRÁZOVÁ et al., 2015; MCGREW et al., 2015; TELLEZ & MERCHANT, 2015; SURES et al., 2017). Pesticides impact the environment and biodiversity and have been related to human pathologies linked to occupational activity and consumption of horticulturally exposed products (AKTAR et al., 2009).

Recently, we demonstrated that exposure to the herbicide, Roundup®, can affect the life cycle and water dependent larval stages of the trematode, *Echinostoma paraensei*, Lie & Basch, 1967, causing miracidia and cercariae mortality and reducing egg development to concentrations below those recommended for agricultural use (MONTE et al., 2016). *E. paraensei* is a foodborne trematode whose vertebrate host is the semi-aquatic rodent, *Nectomys squamipes* Brants, 1827 (LIE & BASCH, 1967; MALDONADO et al., 2001; BONVICINO et al., 2008). Because it is semi-aquatic, these rodents are naturally exposed to pesticides and pesticide degradation products in the environment (ERNEST & MARES, 1986; BONVICINO et al., 2008). However, little is known about the pesticide's effects on helminth parasites (MONTE & MALDONADO, 2017).

Therefore, this study investigated the morphological effects on the newly excysted larvae (NEL) and adult stages of *E. paraensei* after herbicide exposure.

## Materials and Methods

### Parasites and experimental infection

Helminth isolates were obtained from the wild rodents, *N. squamipes* (MALDONADO et al., 2001). The life cycle of *E. paraensei* was maintained in the Laboratory of Biology and Parasitology of Wild Mammal Reservoirs (Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, Brazil) through passages in *Mesocricetus auratus* Waterhouse, 1839 (hamsters) and *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (GARCIA et al., 2011). All animal experiments were conducted per the rules of the Oswaldo Cruz Foundation's Ethical Committee on Animal Use (License LW-51/14). To obtain newly excysted larvae (NEL), metacercarial cysts were recovered by stereomicroscopic dissection of the pericardial region of *B. glabrata* experimentally infected with *E. paraensei*.

Metacercariae were placed in alkaline trypsin bile salts medium (TB medium) containing 0.5% trypsin (1:250, C, GIBCO) and 0.5% bile salts (Sigma-Aldrich) with Earle's balanced salt solution (Earle's BSS), for the *in vitro* excystation (SOUZA et al., 2013).

Four female hamsters, aged three weeks, were experimentally infected. Each animal was administered 50 *E. paraensei* metacercariae by gavage obtained as described above, to obtain helminths at seven and fourteen days post-infection. The hamsters received commercial pellet food (Nuvilab) and water *ad libitum* and were maintained under a 12 h light/dark cycle, at 22 °C and 50% humidity.

Two animals were euthanized in each period (7 and 14 days) after

being anesthetized using ketamine (5 mg/kg, body weight) and xylazine (0.5 mg/100 g, body weight) and subsequently necropsied using a CO<sub>2</sub> chamber, to recover the helminths from the small intestine (FERRAZ et al., 2012).

### Roundup® concentrations and *in vitro* exposure

The pesticide, Roundup® Original (480 g/L isopropylamine salt *N*-(phosphonomethyl) glycine; 360 g/L equivalent acid *N*-(phosphonomethyl) glycine; 684 g/L inert ingredients; Monsanto do Brasil Ltda), was purchased from a commercial source. Successive dilutions were obtained using RPMI 1640 culture medium (Sigma Aldrich), supplemented with 100 U/ml of penicillin, 100 mg/L of streptomycin, 0.25 mg/mL of amphotericin and 20% fetal bovine serum, to obtain the experimental concentrations. A total of 60 NEL, 207-day-old helminths and 20 14-day-old helminths, were washed twice in Locke's solution and transferred to the supplemented RPMI 1640 culture medium containing the following concentrations of Roundup®: 225 mg/L, 450 mg/L or 900 mg/L (exposed group), or to the culture medium alone (control group), for two hours at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> (PANIC et al., 2013). These concentrations are in accordance with those recommended for use in agricultural fields by the manufacturer (1-2%) (MONTE et al., 2016). The assays were performed in duplicate.

For histological analysis, 14-day-old helminths were exposed only to the highest concentration of Roundup® (900 mg/L) for 2 hours.

### Morphological analysis

For scanning electron microscopy (SEM), the specimens (NEL, 7-day-old and 14-day-old helminths) were removed from the culture medium after 2 hours of exposure, transferred to petri dishes with Locke's solution and gently washed. After that, the samples were fixed for 1 hour in 2.5% glutaraldehyde diluted in 0.1 M sodium cacodylate buffer containing 3.5% sucrose at 4 °C, washed in the same buffer at pH 7.2, and post-fixed for 2 hours at 4 °C in a solution of 1% O<sub>5</sub>O<sub>4</sub> in 0.1 M sodium cacodylate buffer. The specimens were then dehydrated through an ascending ethanol series (30-100%), for 1 hour at each step, with three passages in absolute ethanol, and dried using the critical point method with CO<sub>2</sub> (GONÇALVES et al., 2013). The material was mounted on aluminum stubs, coated with an approximately 20-nm layer of gold, and analyzed using a Jeol JSM 6390LV scanning electron microscope, in the Rudolf Barth Electron Microscopy Platform of IOC/Fiocruz.

For the histopathological analysis, the 14-day-old helminths were exposed for 2 hours to 900 mg/L of Roundup®. The helminths were then gently washed with Locke's solution and placed in Carson's Millonig formalin for 24 h. Next, the material was dehydrated through increasing concentrations of ethanol, clarified with xylene and embedded in liquid paraffin at 60 °C (TOLOSA et al., 2003). The inclusion was orientated to observe transverse sections of the helminth body structure. Subsequently, 5-µm thick serial sections

and Periodic Acid-Schiff (PAS) reagents (CAPUTO et al., 2010). Histological sections from six helminths were measured to evaluate the damage caused by the herbicide. Measurements of the cecum, the distance between the inner border and the lumen of the cecum (cell hypotrophy) (4 measurements performed in each cecum) and the number of cecum epithelial cells were inferred from the number of nuclei observed. The tegument thickness from the external membrane to basal lamina and the number of acinus vitelline glands were also measured. Sections were viewed through a Zeiss Axio Scope.A1 and the images were captured by a Zeiss Axio Cam MRc camera. Measurements were processed using the Axio Zen 2 lite software.

For confocal scanning laser microscopy (CSLM), the 14-day-old helminths were exposed for 2 hours to 900 mg/L of Roundup®. The specimens were stained with hydrochloric carmine, dehydrated through a graded ethanol series, cleared with methyl salicylate and mounted in Canada balsam (SOUZA et al., 2011). The material was then analyzed using a Leica TCS SP8 confocal microscope and a 488-nm argon laser.

### Statistical analysis

The paired t-test was used to compare the mean differences among measures performed on the cecum, the tegument thickness to the basal lamina and the acinus vitelline glands for the control and experimental groups. All data were tested for normal distribution using the Kolmogorov-Smirnov test. Values with  $p \leq 0.05$  were considered significant (InStat, GraphPad, v.4.00, Prism, GraphPad, v.3.02, Prism, Inc.).

## Results

### Scanning electron microscopy (SEM)

The NEL showed preserved oral and ventral suckers with presence of papillae, as well as the peristomic collar, with slightly longer lateral and corner spines (Figures 1A, B). In the group exposed to 225 mg/L of Roundup®, an intense musculature contraction of the posterior end was observed, forming a node (Figure 1C). The oral and ventral suckers of the 7- and 14-day-old helminths were well-defined and preserved as was the excretory

pore (Figures 1D-F). In the 14-day-old helminths, vesicle scattering was evident in some areas of the body, including in the excretory pore (Figure 1G), and swollen tegument was noted with the spines submerged by the surrounding tegument (Figure 1H). In the group exposed to 450 mg/L, the 7-day-old helminths lost their peristomic collar spines (Figure 1I), and the 14-day-old helminths showed dorsal surface peeling (Figure 1J). The group exposed to 900 mg/L also presented swelling and furrowing along with spine loss in the peristomic collar (Figure 1L) as well as muscular contraction in the post-acetabular region (Figure 1M).

### Histopathological analysis

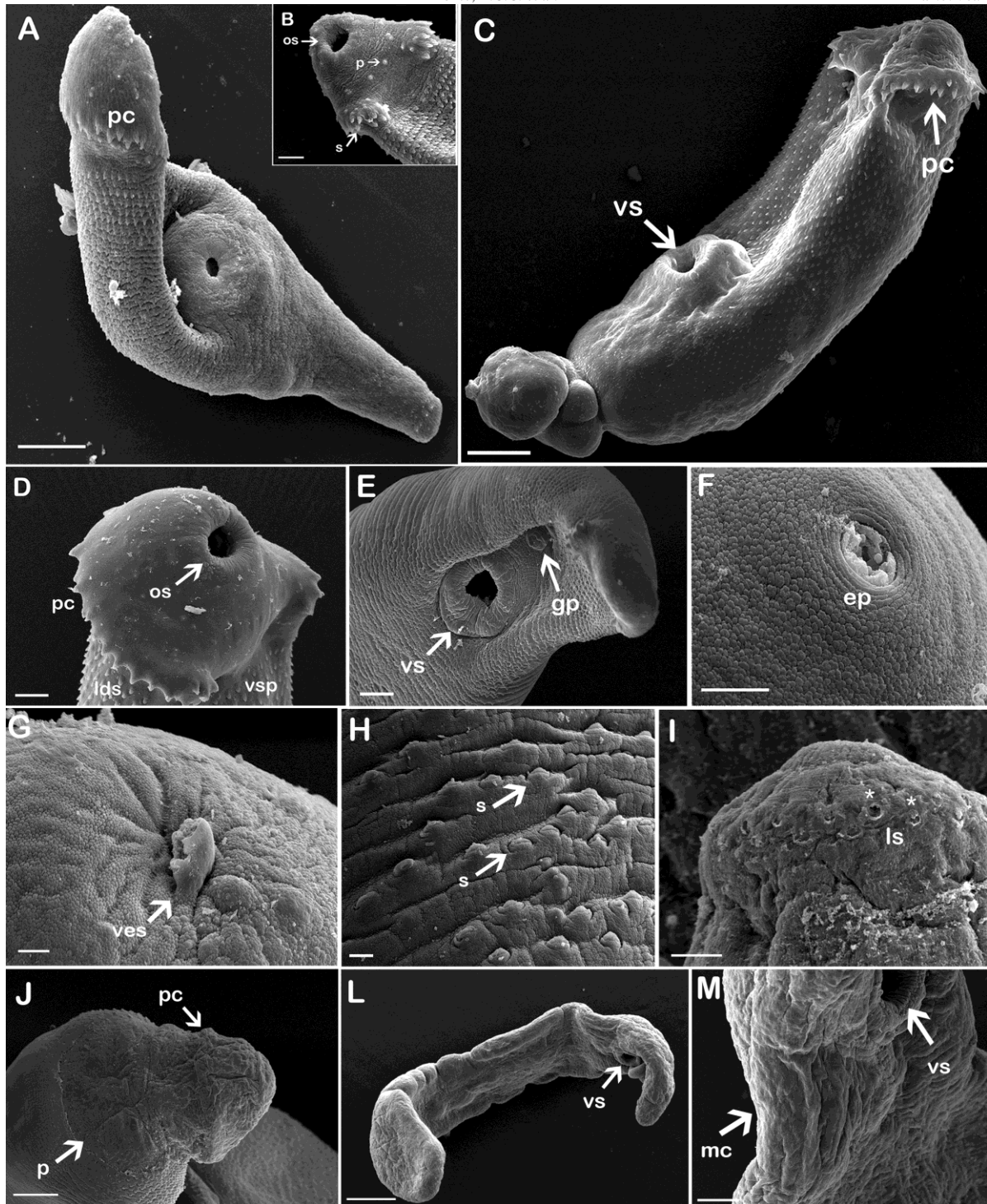
The control group had cecum formed by cylindrical cells with basal nuclei and cells with one or two nucleoli (Figure 2A), while the exposed group presented vacuolated cecal epithelial cells (Figure 2B). The testes contained rosette-shaped structures with sperm bundles appearing normal in the control group (Figure 2C), but after two hours of exposure, spermatogenesis was evident in the testes within the gonad due to disruption of the testicular parenchyma (Figure 2D). The control group tegument presented well-defined structures with syncytium, basal lamina, circular and longitudinal muscle layers and loose connective tissue with parenchyma cells inside the trematode body (Figure 2E). After two hours of exposure, the tegument changed, with reduced and damaged structures and disrupted and disorganized muscle layers. Parenchymal cells associated with the tegument were disordered (Figure 2F). A significant difference was observed between the control and exposed groups in comparing the means for cecal cell hypotrophy, the distance between the cecal border and the lumen and the number of parenchyma cells. However, no significant difference was observed in the cecal area of between the two groups. Significant differences were also observed for the thickness of tegument to basal lamina and the number of acinus vitelline glands compared to the control and exposed groups (Table 1).

Additionally, after 2 hours of exposure, the PAS stained histological sections, presented decreased glycidic content compared to the control group, mainly in the connective tissue around the cecum and the vitelline glands, as well as in the acinus vitelline glands themselves. Tegument loss was observed in the basal lamina (Figures 3A, B). Spermatogenesis was not altered upon histological observation (Figure 3B). The Gomori's reticulin stain revealed

**Table 1.** Measurements from histological sections from six *Echinostoma paraensei* specimens to evaluate the damages caused by the herbicide Roundup®, performed in duplicate.

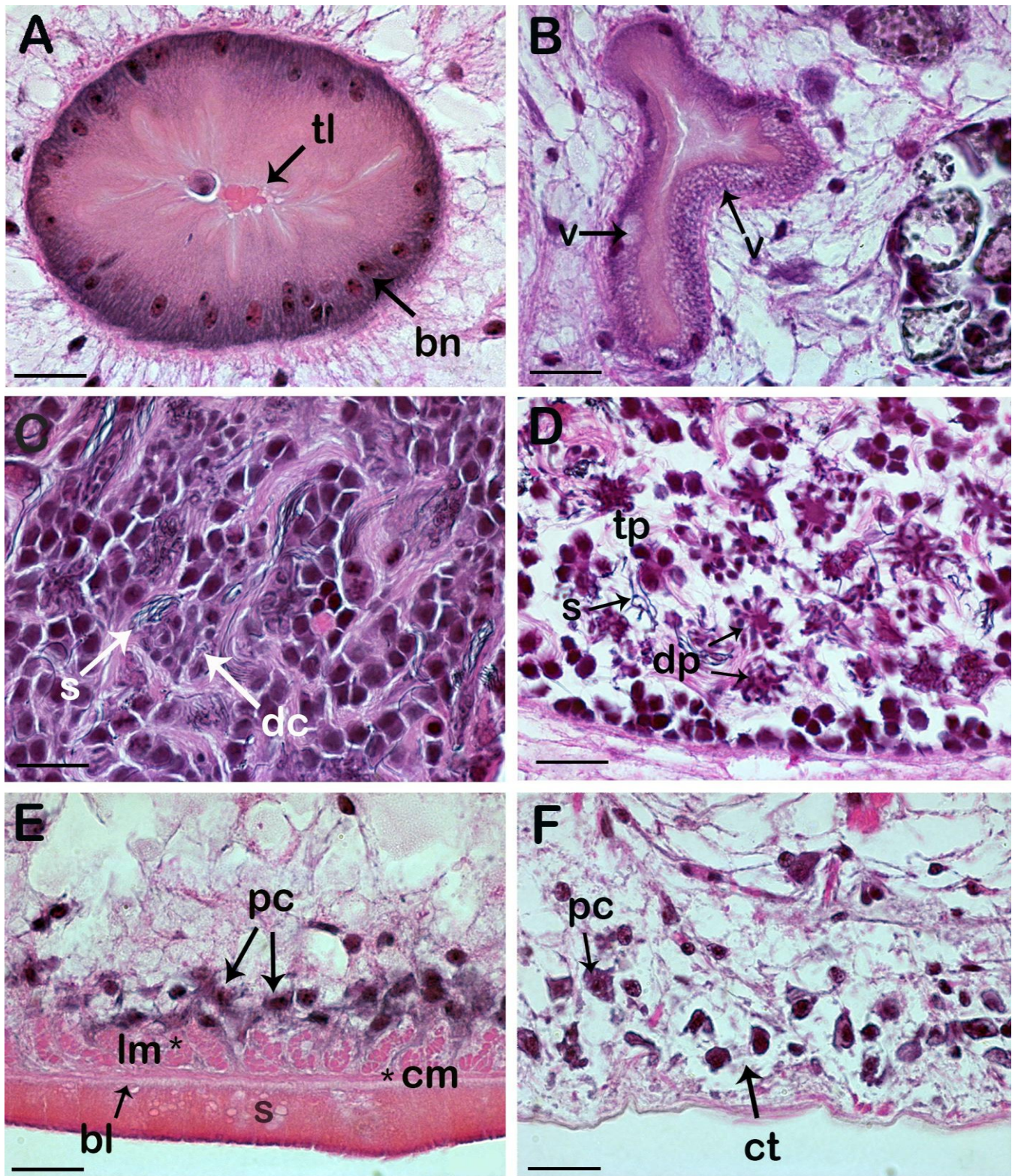
	14-day-old Helminths				
	Control group	Exposed group (900 mg/L)			
	Mean±SD	Mean±SD	t	p	df
<b>Cecum</b>					
Area (µm <sup>2</sup> )	6216.7 ± 2243.3	6950.3 ± 1294.8	0.69	0.5036	5
Cell hypotrophy area (µm <sup>2</sup> )	134.3 ± 77.7	2716.2 ± 1231.8	5.00	<0.01	5
Border - lumen (µm)	28.8 ± 5.6	14.2 ± 2.9	4.54	<0.01	5
N° parenchyma cells	23.3 ± 3.5	14.6 ± 2.6	4.24	<0.01	5
<b>Tegument - Basal lamina (µm)</b>	8.7 ± 1.9	3.7 ± 0.8	4.84	<0.01	5
<b>N° acinus vitelline glands</b>	17.2 ± 3.3	12.8 ± 3.3	5.70	<0.01	5





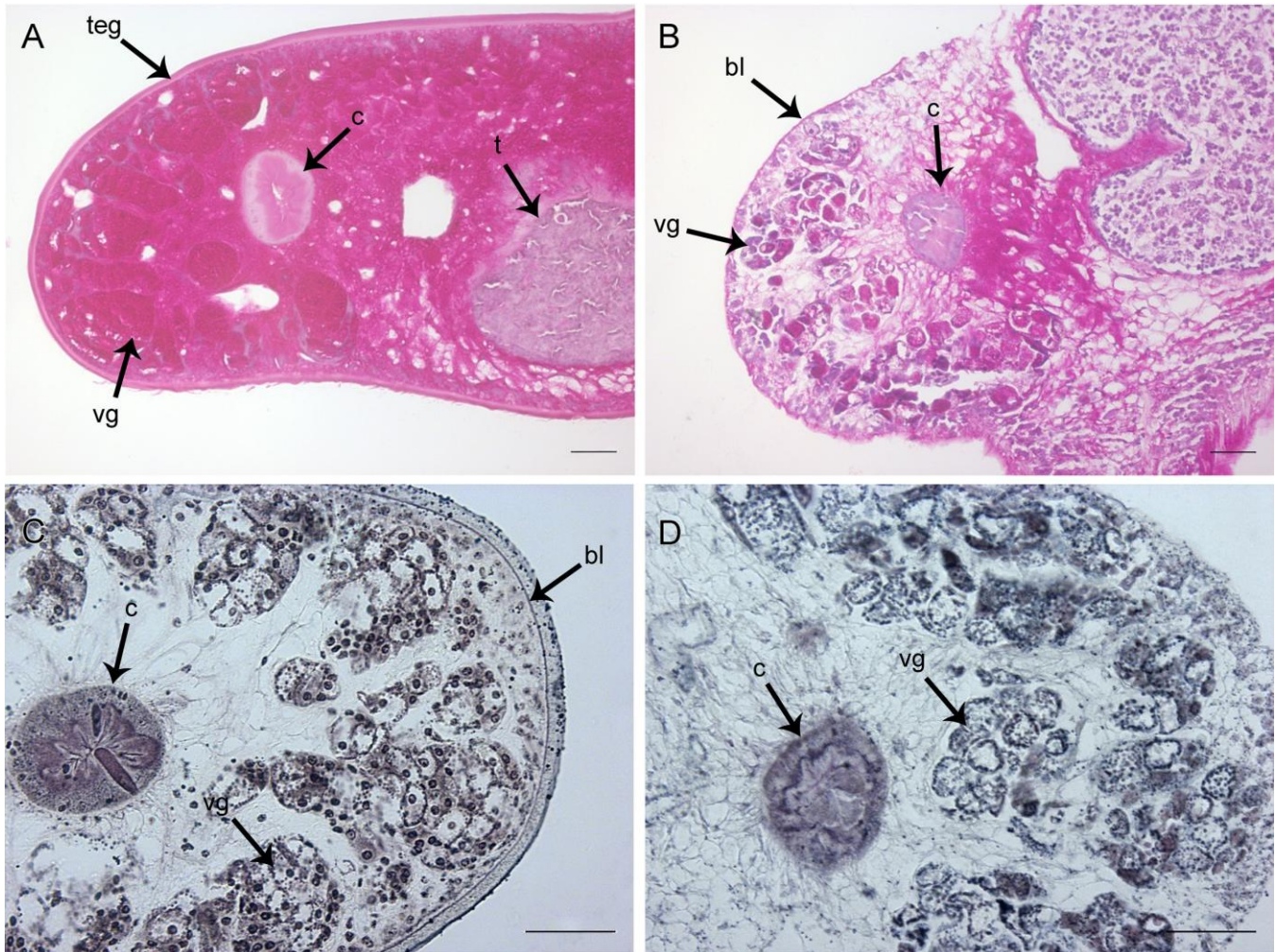
**Figure 1.** Scanning electron micrograph of *Echinostoma paraensei*. (A, B) Control group: NEL - Preserved peristomic collar (pc) (A). Bar: 20  $\mu$ m. Detail of preserved oral sucker (os) surrounded by peristomic collar with spines (s) and presence of papillae (p) (B). Bar: 10  $\mu$ m; (C) Group exposed for two hours to 225 mg/L of Roundup<sup>®</sup>: NEL - Furrowing tegumental surface, including the ventral sucker (vs) and peristomic collar region (pc), and a posterior end node due to intense musculature contraction. Bar: 20  $\mu$ m; (D-F) Control group: 7-old-day helminths - Peristomic collar (pc) and oral sucker (os) with preserved morphology. Preserved latero-dorsal spines (lds) and ventral spines (vsp) (D). Bar: 20  $\mu$ m. 14-old-day helminths - Preserved ventral sucker (vs) and prominent genital pore (gp) (E). Bar: 100  $\mu$ m. Fourteen-old-day helminths - Excretory pore (ep) with preserved aspect (F). Bar: 10  $\mu$ m; (G, H) Group exposed for two hours to 225 mg/L of Roundup<sup>®</sup>: 14-old-day helminths - Excretory pore tegument with vesicles (ves) (G). Bar: 10  $\mu$ m. Swollen tegument with spines (s) submerged by the surrounding tegument (H). Bar: 10  $\mu$ m; (I-M) Group exposed for two hours to 450 mg/L and 900 mg/L of Roundup<sup>®</sup>: 7-old-day helminths - Peristomic collar region with loss of spines (\*Is) (I). Bar: 20  $\mu$ m. 14-old-day helminths - Peeling of the dorsal region of the body (p) and shrinkage of the peristomic collar with no spines (pc) (J). Bar: 100  $\mu$ m. Body with swollen and furrowed tegument. Ventral sucker (vs) (L). Bar: 500  $\mu$ m. Muscle contraction (mc) in the post acetabular region (vs) (M). Bar: 100  $\mu$ m.





**Figure 2.** Histological sections of 14-old-day *Echinostoma paraense* HE-stained. (A) Control group: Cecum with thin lumen (tl) and cylindrical cells with basal nucleus (bn) with one or two nucleoli; (B) Group exposed for two hours to 900 mg/L of Roundup®: Cecum cells with presence of vacuoles (v) (C) Control group: Testis with normal appearance of cell division (dc) with sperm bundle (s); (D) Group exposed for two hours to 900 mg/L of Roundup®: Disruption of the testicular parenchyma (tp) evidencing the differentiation process (dp), with presence of sperm (s); (E) Control group: Preserved tegument with syncytium (s), basal lamina (bl), circular (\*cm) and longitudinal muscle layer (\*lm), and loose connective tissue with parenchyma cells (pc); (F) Group exposed for two hours to 900 mg/L of Roundup®: Changed tegument (ct) with disordered parenchymal cells (pc). Bar: 50 µm.





**Figure 3.** Histological sections of 14-old-day *Echinostoma paraensei* stained in PSA and Gomori's Reticulin. PSA: (A) Control group: Presence of intense glycidic content in the parenchyma and acinus vitelline glands (vg). Cecum (c), testis (t) and tegument (teg) preserved; (B) Group exposed for two hours to 900 mg/L of Roundup®: decreased glycidic content in the parenchyma and vitelline glands (vg) with basal lamina (bl) evident by loss of tegument. Cecum (c). Gomori's Reticulin: (C) Control group: Cecum (c) and vitelline glands (vg) with preserved morphology. Evident basal lamina (bl); (D) Group exposed for two hours to 900 mg/L of Roundup®: degeneration of the cecum (c) and vitelline cells (vg) showing no nuclei. Bar: 50 µm.

tegument loss with deteriorated basal lamina and degenerated cecum and vitelline cells with no nuclei (Figures 3C, D). No changes were observed in the parenchymal reticular fibers of the control and experimental groups.

### Confocal scanning laser microscopy (CSLM)

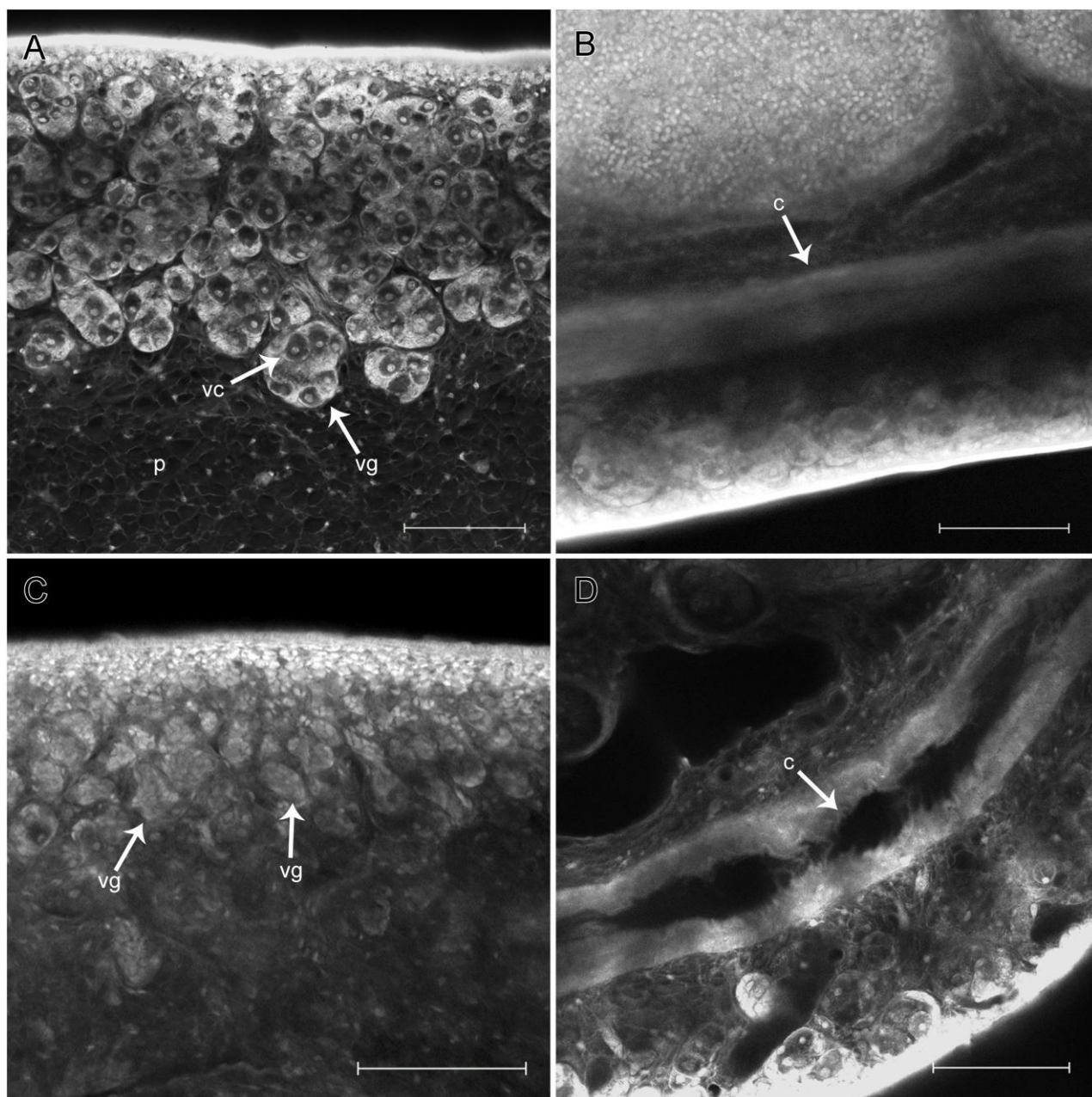
CSLM revealed changes primarily to the vitellic glands and cecum. The control group revealed preserved acinus vitelline glands with vitellic cells presenting normal nuclei as well as normal body parenchyma (Figure 4A) and the cecum was preserved with a thin lumen (Figure 4B). After exposure the acinus vitelline glands were disorganized with cells revealing nuclei loss (Figure 4C), and the cecum was altered with epithelial damage to the cecum, evidencing an apparent dilated lumen (Figure 4D).

## Discussion

Subsequent to the expanded use of herbicide in agricultural practices, studies have verified that herbicidal effects are not restricted to the target species for which they were designed (LANGIANO & MARTINEZ, 2008; LANCTOT et al., 2014). Since then accumulating evidence has shown the effects of herbicide on the diverse trophic levels, including parasitic helminths. However, there is little information on these effects and their mechanisms of action.

Recent evidence has shown the effects of *in vitro* exposure to the herbicide, Roundup®, on the trematode parasite, *E. paraensei*, whose biological cycle requires fresh water. Exposure to low concentrations of the herbicide can lead to larval stages death in the cercariae and miracidia and impair larval embryonic development inside the eggs (MONTE et al., 2016). These findings were attributed





**Figure 4.** Confocal scanning laser microscopy images of whole-mounts preparations of 14-old-day *Echinostoma paraensei* stained with hydrochloric carmine: (A) Control group: Preserved acinus vitelline glands (vg) with vitellic cells (vc) with normal aspect as well as the body parenchyma (p); (B) Control group: Cecum with preserved form with thin lumen (c); (C) Group exposed for two hours to 900 mg/L of Roundup®: Acinus vitelline glands with cells with lost nuclei (vg); (D) Group exposed for two hours to 900 mg/L of Roundup®: altered cecum with apparent damage to the cecal epithelium (c). Bar 100  $\mu$ m.

primarily to the presence of the surfactant in the commercial formulation, polyethoxylated tallow amine (POEA), an emulsifier that facilitates glyphosate entry and diffusion through plant cell walls to increase its effectiveness (WILLIAMS et al., 2000). In this study, morphological and histopathological alterations in this trematode after exposure to Roundup® were observed. However, few morphological studies are available on this herbicide that concern parasitic helminths (MONTE & MALDONADO, 2017).

Our results demonstrated that in the control group, all specimens showed general morphology similar to that previously described by Maldonado et al. (2001), such as an elongated and slender body with lateral borders curved ventrally on the longitudinal axes, enlarging from the ventral sucker onwards. The lowest concentration tested could promote tegumental surface damage. Similar alterations were observed after exposure to the antihelminthic, praziquantel, on the surface of trematodes, including swollen and pronounced changes

of the peristomic region and peeling and formation of vesicles (FERRAZ et al., 2012; GONÇALVES et al., 2013), suggesting that the anthelmintic acts by disrupting calcium homeostasis (GREENBERG, 2005).

Likewise, *in vitro* studies on *Echinostoma caproni* Richard, 1964 and a trematode of the genus, *Schistosoma*, also noted tegumental damage and curling, body shrinkage and vesiculation along the tegumental surface after treatment with different anthelmintics related to changes in muscular activity (praziquantel, tribendimidine, albendazole and quinine) (XIAO et al., 2009; PANIC et al., 2013). Changes in motor activity with intense body contraction and loss of the muscle layer underlying the tegument were also seen in *E. paraensei*.

Tansatit et al. (2012), compared the *in vitro* effects of triclabendazole and a derivate of artemisinin (artesunate) on *Fasciola gigantica* Cobbold, 1855 and observed similar morphological changes from both drugs, primarily consisting of swollen and disrupted tegument with blebbing and erosion. These findings were also observed by Souza et al. (2017) using *E. paraensei* newly excysted metacercariae treated with artesunate. Although the chemical species tested in these studies have different formulations, similar alterations were observed in our study, indicating that these formulations initially act on the same targets on the tegumentary surface, altering the membrane stability. The commercial composition of the pesticide tested in this study includes the surfactant POEA, which can alter tegumental integrity. This can be related to an imbalance in osmosis, resulting in a disturbed ion flux across the membrane, as already observed in other substances (MEHLHORN et al., 1983; SCHMAHL & MEHLHORN, 1985; SOBHON et al., 1986).

Histological changes caused by *in vitro* exposure to the herbicide, norflurazon, in planarian *Polycelis felina* Dalyell, 1814, revealed damage to the outer mucosal layer, epidermis and parenchymal cells (HORVAT et al., 2005). Degradation of parenchymal tissue with cell injury was also seen in this study, along with impaired tegument. These studies suggest potential cytotoxic effects from these herbicides on platyhelminths with consequent death based on the concentration to which they were exposed.

In a recent study, the earthworm, *Eisenia fetida* Savigny, 1826, was compared histopathologically using five pesticides (insecticides and fungicides), and the results verified damage to the muscular layers, potentially resulting in nervous systems disorders (RICO et al., 2016). Although these studies involved other pesticide classes, we found that Roundup® Original led to disrupted and disorganized muscle layers, spastic movements and formation of a node in the post-acetabular region after two hours of exposure, suggesting nervous system involvement. More studies are needed to clarify these results.

Some studies have shown that glyphosate-based herbicide exposure decreases glycogen levels in different organisms (DORNELLES & OLIVEIRA, 2014; SINHORIN et al., 2014). This polysaccharide is essential for energy balance because it provides an internal energy reserve, and its depletion is associated with stress from environmental pollutants exposure, since the increased energy demand helps the metabolism involved in detoxifying xenobiotics (MOYES & SCHULTE, 2010). The present study evaluated acute exposure to the herbicide and observed a loss of glycidic content in *E. paraensei*, which may include glycogen, glycoproteins and

glycolipids in the cells and cell membranes (VUTUKURU, 2005). This may be from the parasite's attempt to eliminate the toxic pollutant as previously described.

Few studies report the effects caused by glyphosate-based herbicides on the connective tissue, specifically on the reticular fibers that are primarily formed by type III collagen fibers. Histological observations of rodent liver cells exposed to the highest concentration of glyphosate-based herbicide, found increased connective tissue and reticulin fiber deposition, suggesting modified substance diffusion and impaired hepatic function (BENEDETTI et al., 2004). Our data did not show reticular fiber changes in the helminths exposed to Roundup®. This may be due to the short exposure period, with insufficient time for the increased deposition of type III collagen fibers.

Although different studies have evaluated the effects of the Roundup® on other model organisms, most of these studies focused on the biological and physiological impact of this herbicide (ADAM et al., 1997; LANGIANO & MARTINEZ, 2008; LANCTOT et al., 2014), and few studies exist regarding the ultrastructural effects. In conclusion, our data indicate that in addition to the biological effects on *E. paraensei*, morphological changes also occurred after exposure to Roundup® under experimental conditions. As *E. paraensei* is an intestinal parasite of the semi-aquatic wild rodent, *N. squamipes*, it is thus predisposed to agricultural pesticide exposure. Therefore, we emphasize the need to evaluate the herbicide's impact on parasitic helminths, since it is pivotal in regulating the hosts population.

## Acknowledgements

We would like to thank to the Rudolf Barth Electron Microscopy Platform from the Oswaldo Cruz Institute/Fiocruz and the Program in Biodiversity and Health (PPGBS), the Vice Presidency of Education, Information and Communication (VPEIC) of the Oswaldo Cruz Institute/Fiocruz, the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (400061/2013-9) for financial support, and also thank Ricardo Baptista Schimidt for the image services.

## References

- Adam A, Marzuki A, Abdul Rahman H, Abdul Aziz M. The oral and intratracheal toxicities of ROUNDUP® and its components to rats. *Vet Hum Toxicol* 1997; 39(3): 147-151. PMID:9167243.
- Aktar MW, Sengupta D, Chowdhury A. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdiscip Toxicol* 2009; 2(1): 1-12. PMID:21217838. <http://dx.doi.org/10.2478/v10102-009-0001-7>.
- Benedetti AL, Vituri CL, Trentin AG, Domingues MAC, Alvarez-Silva M. The effects of sub-chronic exposure of Wistar rats to the herbicide Glyphosate-Biocarb. *Toxicol Lett* 2004; 153(2): 227-232. PMID:15451553. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2004.04.008>.
- Bonvicino CR, Oliveira JA, D'Andrea PS. *Guia dos roedores do Brasil, com chaves para gêneros baseados em caracteres externos*. Rio de Janeiro: Centro Pan-Americano de Febre Aftosa, OPAS/OMS; 2008. 120 p.



- Brázová T, Hanzelová V, Miklisová D, Salamun P, Vidal-Martínez VM. Host-parasite relationships as determinants of heavy metal concentration in perch (*Perca fluviatilis*) and its intestinal parasite infection. *Ecotoxicol Environ Saf* 2015; 122: 551-556. PMID:26432028. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.09.032>.
- Caputo LFG, Gitirana LB, Manso PPA. Técnicas histológicas. In: Molinaro EM, Caputo LFG, Amendoeira MRR. *Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde*. Rio de Janeiro: Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio; 2010. p. 89-188. (vol.2).
- Dornelles MF, Oliveira GT. Effect of atrazine, glyphosate and quinclorac on biochemical parameters, lipid peroxidation and survival of bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*). *Arch Environ Contam Toxicol* 2014; 66(3): 415-429. PMID:24276472. <http://dx.doi.org/10.1007/s00244-013-9967-4>.
- Ernest KA, Mares MA. Ecology of *Nectomys squamipes*, the Neotropical Water rat, in central Brazil: home range, habitat selection, reproduction and behaviour. *J Zool* 1986; 210(4): 599-612. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-7998.1986.tb03658.x>.
- Ferraz J, Souza J, Costa-Silva M, Torres E, Santana A, Lanfredi R, et al. Effect of praziquantel on adult *Echinostoma paraensei* worms in experimentally infected mice. *Parasitol Res* 2012; 111(1): 143-148. PMID:22249761. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-011-2810-9>.
- Garcia JS, Hooper CS, Simões RO, Dos Santos MA, Maldonado A Jr, Pinheiro J. Biochemical and histological responses of *Rattus norvegicus* (Wistar) infected by *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae). *Vet Parasitol* 2011; 178(1-2): 86-92. PMID:21255935. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.12.040>.
- Gonçalves JP, Oliveira-Menezes A, Maldonado A Jr, Carvalho TMU, Souza W. Evaluation of praziquantel effects on *Echinostoma paraensei* ultrastructure. *Vet Parasitol* 2013; 194(1): 16-25. PMID:23312867. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.042>.
- Greenberg RM. Are Ca<sup>2+</sup> channels targets of praziquantel action? *Int J Parasitol* 2005; 35(1): 1-9. PMID:15619510. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.09.004>.
- Horvat T, Kalafatic M, Kopjar N, Kovacevic G. Toxicity testing of herbicide norflurazon on an aquatic bioindicator species - the planarian *Polycelis felina* (Daly.). *Aquat Toxicol* 2005; 73(4): 342-352. PMID:15899527. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.03.023>.
- Lancôt C, Navarro-Martin L, Robertson C, Park B, Jackman P, Pauli BD, et al. Effects of glyphosate-based herbicides on survival, development, growth and sex ratios of wood frog (*Lithobates sylvaticus*) tadpoles. II: Agriculturally relevant exposures to Roundup WeatherMax® and Vision under laboratory conditions. *Aquat Toxicol* 2014; 154: 291-303. PMID:24912403. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.05.025>.
- Langiano VC, Martinez CBR. Toxicity and effects of glyphosate-based herbicide on Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2008; 147(2): 222-231. PMID:17933590. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.09.009>.
- Lie KJ, Basch PF. The life history of *Echinostoma paraensei* sp. n. (Trematoda: Echinostomatidae). *J Parasitol* 1967; 53(6): 1192-1199. PMID:6078607. <http://dx.doi.org/10.2307/3276679>.
- Maldonado A Jr, Loker ES, Morgan JA, Rey L, Lanfredi RM. Description of the adult worms of a new Brazilian isolate of *Echinostoma paraensei* (Platyhelminthes: Digenea) from its natural vertebrate host *Nectomys squamipes* by light and scanning electron microscopy and molecular analysis. *Parasitol Res* 2001; 87(10): 840-848. PMID:11688891. <http://dx.doi.org/10.1007/s004360100451>.
- McGrew AK, O'Hara TM, Stricker CA, Castellini JM, Beckmen KB, Salman MD, et al. Ecotoxicoparasitology: Understanding mercury concentrations in gut contents, intestinal helminths and host tissues of Alaskan gray wolves (*Canis lupus*). *Sci Total Environ* 2015; 536: 866-871. PMID:26283618. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.07.106>.
- Mehlhorn H, Kojima S, Rim HJ, Ruenwongsa P, Andrews P, Thomas H, et al. Ultrastructural investigations on the effects of praziquantel on human trematodes from Asia: *Clonorchis sinensis*, *Metagonimus yokogawai*, *Opisthorchis viverrini*, *Paragonimus westermani* and *Schistosoma japonicum*. *Arzneimittelforschung* 1983; 33(1): 91-98. PMID:6338885.
- Monte TCC, Garcia J, Gentile R, Vasconcellos MC, Souza J, Braga BV, et al. *In vivo* and *in vitro* effects of the herbicide Roundup® on developmental stages of the trematode *Echinostoma paraensei*. *Exp Parasitol* 2016; 169: 43-50. PMID:27373431. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2016.06.012>.
- Monte TCC, Maldonado A Jr. What do we know about the effects of pesticides on helminths? *JSM Biol* 2017; 2(1): 1008.
- Moyes CD, Schulte PM. *Princípios de fisiologia animal*. Porto Alegre: Art Med; 2010. p. 526-571.
- Panic G, Ingram K, Keiser J. Development of an *in vitro* drug sensitivity assay based on newly excysted larvae of *Echinostoma caproni*. *Parasit Vectors* 2013; 6(1): 237. PMID:23941505. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-6-237>.
- Rico A, Sabater C, Castillo MA. Lethal and sub-lethal effects of five pesticides used in rice farming on the earthworm *Eisenia fetida*. *Ecotoxicol Environ Saf* 2016; 127: 222-229. PMID:26874341. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.02.004>.
- Schmahl G, Mehlhorn H. Treatment of fish parasites. 1. Praziquantel effective against monogenea (*Dactylogyrus vastator*, *Dactylogyrus extensus*, *Diplozoon paradoxum*). *Z Parasitenkd* 1985; 71(6): 727-737. PMID:4082732. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00926798>.
- Sinhorin VDG, Sinhorin AP, Teixeira JMS, Mileski KML, Hansen PC, Moeller PR, et al. Metabolic and behavior changes in *Surubim* acutely exposed to a glyphosate-based herbicide. *Arch Environ Contam Toxicol* 2014; 67(4): 659-667. PMID:25147081. <http://dx.doi.org/10.1007/s00244-014-0073-z>.
- Sobhon P, Wanichanon C, Saitongdee P, Koonchornboon T, Bubphaniroj P, Upatham ES, et al. Scanning electron microscopic study of *Opisthorchis viverrini* tegument and its alterations induced by amoscanate. *Int J Parasitol* 1986; 16(1): 19-26. PMID:3699972. [http://dx.doi.org/10.1016/0020-7519\(86\)90060-3](http://dx.doi.org/10.1016/0020-7519(86)90060-3).
- Souza JG, Garcia J, Neves RH, Machado-Silva JR, Maldonado A. *In vitro* excystation of *Echinostoma paraensei* (Digenea: Echinostomatidae) metacercariae assessed by light microscopy, morphometry and confocal laser scanning microscopy. *Exp Parasitol* 2013; 135(4): 701-707. PMID:24184079. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2013.10.009>.
- Souza JG, Lopes Torres EJ, Garcia JS, Gomes AP, Rodrigues-Silva R, Maldonado A Jr, et al. Light and scanning electron microscopy study of *in vitro* effects of artesunate in newly excysted metacercariae of *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Digenea). *Exp Parasitol* 2017; 174: 10-16. PMID:28131660. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2017.01.003>.
- Souza JGR, Garcia JS, Manso PPA, Neves RH, Maldonado AJ Jr, Machado-Silva JR. Development of the reproductive system of *Echinostoma paraensei* in *Mesocricetus auratus* analyzed by light and confocal scanning laser microscopy. *Exp Parasitol* 2011; 128(4): 341-346. PMID:21554877. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2011.04.005>.

Sures B, Nachev M, Selbach C, Marcogliese DJ. Parasite responses to pollution: what we know and where we go in “Environmental Parasitology”. *Parasit Vectors* 2017; 10(1): 65. PMID:28166838. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-017-2001-3>.

Tansatit T, Sahaphong S, Riengrojpitak S, Viyanant V, Sobhon P. *Fasciola gigantica*: The *in vitro* effects of artesunate as compared to triclabendazole on the 3-weeks-old juvenile. *Exp Parasitol* 2012; 131(1): 8-19. PMID:22425749. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2012.02.018>.

Tellez M, Merchant M. Biomonitoring heavy metal pollution using an aquatic apex predator, the american alligator, and its parasites. *PLoS One* 2015; 10(11): e0142522. PMID:26555363. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0142522>.

Tolosa EMC, Rodrigues CJ, Behmer OA, Freitas-Neto AG. *Manual de técnicas para histología normal e patológica*. São Paulo: Manole; 2003. p. 37.

Vutukuru SS. Acute effects of hexavalent chromium on survival, oxygen consumption, hematological parameters and some biochemical profiles of the Indian major carp, *Labeo rohita*. *Int J Environ Res Public Health* 2005; 2(3): 456-462. PMID:16819101. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph2005030010>.

Williams GM, Kroes R, Munro IC. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup® and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regul Toxicol Pharmacol* 2000; 31(2): 117-165. PMID:10854122. <http://dx.doi.org/10.1006/rtp.1999.1371>.

Xiao SH, Mei JY, Jiao PY. The *in vitro* effect of mefloquine and praziquantel against juvenile and adult *Schistosoma japonicum*. *Parasitol Res* 2009; 106(1): 237-246. PMID:19851783. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-009-1656-x>.

# ANEXO IV

## Manuscript Details

<b>Manuscript number</b>	JIP_2018_188
<b>Title</b>	Changes in hemocytes of <i>Biomphalaria glabrata</i> infected with <i>Echinostoma paraensei</i> and exposed to the herbicide glyphosate
<b>Article type</b>	Full Length Article

### Abstract

The immune system of snails is highly sensitive to pollutants, which can suppress its immune response. We investigate the effects of exposure to Roundup® on the snail *Biomphalaria glabrata* infected by *Echinostoma paraensei*, by evaluating changes in the snail's internal defense system (IDS). Four cohorts were studied: control group (C), snails infected (I), snails treated with Roundup® (T), and snails infected and treatment with Roundup® (I+T). The hemocyte viability was assessed by the Neubauer chamber, morphological differentiation of cells was observed under an optical microscope and flow cytometry was performed to determine the morphology, viability and the lectin expression profiles. The frequencies of dead hemocytes were lower in the (I) group and higher in the (T) and (I+T). Three cell types were identified: blast-like cells, hyalinocytes and granulocytes. The (I+T) group showed the highest number of all types of hemocytes. Flow cytometry identified three regions (low, medium and high) based on their granularity distributions. The cell viability indicated that the (I+T) group showed higher frequencies of dead cells compared to the other experimental groups. The association between infection and herbicides exposure greatly increased the frequencies of dead hemocytes, suggesting impairment of IDS from aquatic snails.

**Keywords** *Echinostoma paraensei*; *Biomphalaria glabrata*; glyphosate; hemocytes; flow cytometry; propidium iodide

**Taxonomy** Biological Sciences, Agriculture

**Corresponding Author** Alvaro Luiz Bertho

**Order of Authors** Tainá C. de C. Monte, Thaize Chometon, Vanessa S. Moura, Mauricio Carvalho de Vasconcelos, Juberlan Garcia, Raquel Ferraz-Nogueira, Alvaro Luiz Bertho, A Maldonado, Marta Faro