



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Renata de Freitas Ximenes

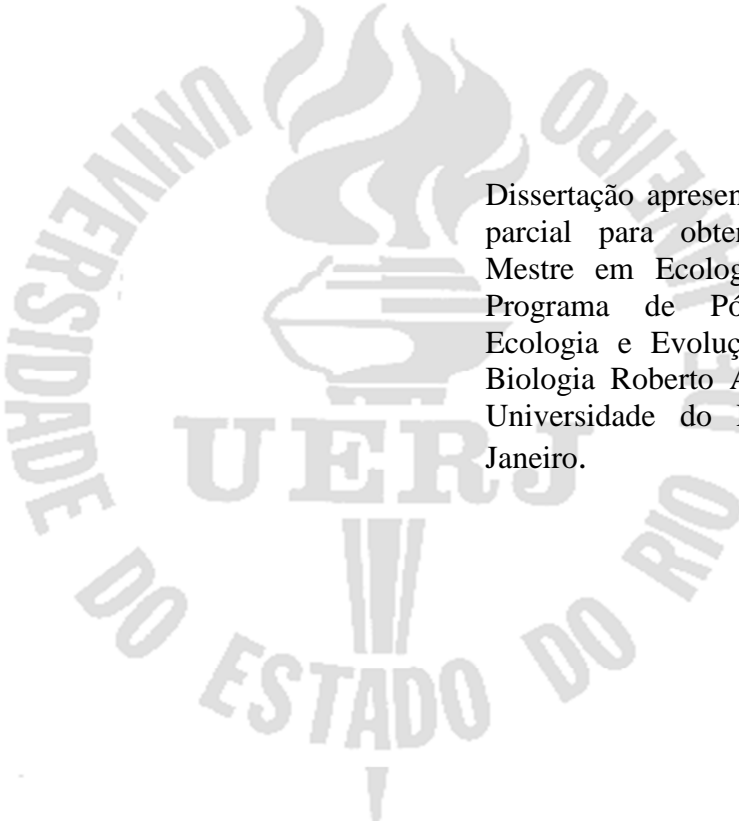
**Reprodução e parasitismo em *Melanoides tuberculata* (Müller, 1774)
(Gastropoda, Thiaridae) da Vila do Abraão, Ilha Grande, Angra dos Reis,
RJ**

Rio de Janeiro

2014

Renata de Freitas Ximenes

Reprodução e parasitismo em *Melanoides tuberculata* (Müller, 1774) (Gastropoda, Thiariidae) da Vila do Abraão, Ilha Grande, Angra dos Reis, RJ



Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Evolução, ao Programa de Pós Graduação em Ecologia e Evolução, do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra Sonia Barbosa dos Santos

Rio de Janeiro

2014

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC-A

X6

Ximenes, Renata de Freitas.

Reprodução e parasitismo em *Melanoides tuberculata* (Müller, 1774) (Gastropoda, Thiariidae) da Vila do Abraão, Ilha Grande, Angra dos Reis, RJ / Renata de Freitas Ximenes. - 2014.

67f: il.

Orientador a: Sonia Barbosa dos Santos.

Dissertação (Mestrado em Ecologia e Evolução) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Inclui bibliografia

1. Gastrópode - Grande, Ilha (RJ) - Teses. 2. Molusco - Reprodução - Teses 3. Parasitismo - Teses. I. Santos, Sonia Barbosa dos. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 594.3(815.3)

Autorizo para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Renata de Freitas Ximenes

Tamanho, parasitismo e maturidade reprodutiva em *Melanoides tuberculata* (Müller, 1774) (Gastropoda, Thiaridae) da Vila do Abraão, Ilha Grande, Angra dos Reis, RJ

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Evolução, ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução, do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 26 de fevereiro de 2014.

Orientadora:

Prof.^a Dra. Sonia Barbosa dos Santos (Orientadora)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Timothy Peter Moulton
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Monica Lemos Ammon Fernandez
Instituto Oswaldo Cruz

Prof.^a Dra. Ester Maria Mota
Instituto Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro
2014

DEDICATÓRIA

Dedico à minha família e a todas as pessoas que me ajudaram e me incentivaram a realizar esse sonho.

AGRADECIMENTOS

À meus pais, Dona Rosa e Seu Raimundo, meus velhinhos, por todo amor, dedicação e apoio.

Ao Rodrigo de Castro Lisbôa Pereira, meu grande amigo, por toda ajuda durante a graduação e durante o mestrado, pelos textos traduzidos e pela paciência.

À minha orientadora, Prof^a Dra. Sonia Barbosa dos Santos, por todo apoio e paciência.

À toda a equipe do Laboratório de Malacologia da UERJ, Igor, Gleisse, Eduardo, Amilcar, Jaqueline, Isabela, Mariana, Regiana, Jessica, Augusto, Thiago e Carol, por toda ajuda, apoio e amizade.

Ao Bruno Lopes, que estagiava no Laboratório de Referência Nacional em Malacologia Médica (FIOCRUZ/RJ), que quando eu estava na graduação, em uma de suas visitas a UERJ, me ajudou a identificar as cercárias.

À Dr^a Marta Julia Faro dos Santos Costa e Dr^a Ester Maria Mota, pois graças a elas pude fazer a parte de Histologia desse trabalho no Laboratório de Patologia do Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ.

À equipe do Laboratório de Patologia, do IOC- FIOCRUZ, especialmente a Dr^a Ester Mota, Andréa da Silva e Thatiane da Silva (Rosinha), que me ajudaram no processamento, montagem e fotografia das lâminas histológicas e à Luzia que fez o corte do material.

Ao Dr. Hudson Alves Pinto e ao Professor Dr. Allan Lane de Melo, do Laboratório de Taxonomia e Biologia de Invertebrados da UFMG, que gentilmente me receberam, juntamente com a colega Isabela Gonçalves, e nos ajudaram com o fechamento do ciclo do parasito encontrado

À toda a equipe do Centro de Estudos Ambientais e Desenvolvimento Sustentável da Ilha Grande (CEADS), pois apesar de eu ter utilizado material em sua maior parte já depositado no Laboratório de Malacologia Límnica e Terrestre, forneceu apoio logístico e infra-estrutura sempre que necessário.

À UERJ pelo apoio financeiro na graduação sob a forma de Bolsas Permanência e de Iniciação Científica (PIBIC/UERJ), e pelos auxílios financeiros para participar de Congressos; à CAPES pela bolsa de Mestrado: ao PPGEE pelos auxílios financeiros; à Faperj e ao CNPq pelos financiamentos concedidos aos projetos de pesquisa em desenvolvimento no Laboratório de Malacologia da UERJ.

À todos os membros da banca que gentilmente aceitaram o convite para participar.

A todos, minha sincera gratidão!

É impossível haver progresso sem mudança e, quem não consegue mudar a si mesmo,
não muda coisa alguma.

George Bernard Shaw

RESUMO

XIMENES, R.F. Reprodução e parasitismo em *Melanooides tuberculata* (Müller, 1774) (Gastropoda, Thiaridae) da Vila do Abraão, Ilha Grande, Angra dos Reis, RJ. 2014. 67f. il. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Evolução)- Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

Melanooides tuberculata (Müller, 1774), molusco exótico límnic de origem afro-asiática, foi registrado pela primeira vez na Vila do Abraão, Ilha Grande, Angra dos Reis, Rio de Janeiro, em 2005. Atua como primeiro hospedeiro intermediário de diversos trematódeos de importância médica. As populações são compostas majoritariamente por fêmeas partenogenéticas que possuem um marsúpio onde se desenvolvem os juvenis. Os objetivos foram verificar: a presença de machos; se existem flutuações na produção de ovos e juvenis ao longo do tempo; quando a maturidade sexual é atingida e, a existência de parasitos relacionando sua presença com o número de ovos e juvenis. Para a contagem de ovos e juvenis, foram utilizadas fêmeas coletadas bimestralmente de setembro/07 a outubro/10, separadas em quatro classes de tamanho, segundo o diâmetro da concha: Classe I: < 3mm; Classe II: 3 a 5,99mm; Classe III: 6 a 8,99mm; Classe IV: > 9mm. Separamos cinco fêmeas/classe, totalizando 20 fêmeas/coleta, exceto nas amostras de setembro/07 (16 exemplares), abril/09 (19 exemplares) e de abril/10 (13 exemplares), totalizando 348 fêmeas. Para observação dos parasitos, ovos e juvenis o teto da cavidade palial foi retirado e o marsúpio dissecado. Classificamos os juvenis em classes de acordo com o número de voltas: com menos de duas; com duas a quatro e com mais de quatro. Os dados foram analisados utilizando Excel e SYSTAT 12. Para a histologia da gônada e do marsúpio, utilizamos cinco exemplares coletados mensalmente de setembro/12 a fevereiro/13, de cada classe de tamanho, totalizando 20 espécimes/coleta, exceto em outubro/12, quando 16 espécimes foram usados, pois somente um espécime da Classe IV foi encontrado. Os espécimes foram fixados em formalina Millonig de Carson, descalcificados em EDTA, incluídos em parafina e corados em hematoxilina e eosina. Foram encontrados 16 machos. Quantificamos 24.694 ovos e 31.474 juvenis, com as seguintes médias: Classe I: 0 ovos e 0,31 juvenis; Classe II: 24,19 ovos e 47,56 juvenis; Classe III: 114,84 ovos e 155,78 juvenis; Classe IV: 146,76 ovos e 158,41 juvenis. O teste de Kruskal-Wallis mostrou que existe variação significativa no número de ovos e juvenis ao longo do ano ($p < 0,01$ para ambos) e entre o número de ovos e juvenis entre as diferentes classes de tamanho de concha ($p < 0,01$ para ambos). Foram contabilizados 27.877 juvenis com menos de duas voltas, 3.251 juvenis com duas a quatro voltas e 346 juvenis com mais de quatro voltas. Dentre 348 fêmeas, 111 estavam parasitadas (32% do total) por *Centrocestus formosanus* (Nishigori, 1924). O Teste de Mann-Whitney, levando em consideração todas as fêmeas, demonstrou que fêmeas parasitadas apresentaram menor número de ovos e juvenis que as não parasitadas ($p < 0,01$). Excluindo as fêmeas da Classe I, o resultado do teste foi o mesmo ($p < 0,01$). Concluímos que: a população de *M. tuberculata* da Vila do Abraão não é formada somente por fêmeas; as fêmeas se reproduzem o ano todo, pois foram encontrados ovos e juvenis em todas as coletas; que quanto maior a fêmea há mais ovos e, em média, há mais juvenis no marsúpio; que a maturidade sexual é alcançada com aproximadamente 3 mm de diâmetro de concha, devido a presença de ovócitos vitelogênicos tardios e, que o parasitismo afeta negativamente *M. tuberculata*, reduzindo o número de ovos e juvenis formados.

Palavras-chave: *Melanooides tuberculata*. Trematódeos. Partenogênese. Ilha Grande. Rio de Janeiro.

ABSTRACT

XIMENES, R.F. Reproduction and parasitism of *Melanooides tuberculata* (Müller, 1774) (Gastropoda, Thiariidae) from Vila do Abraão, Ilha Grande, Angra dos Reis, RJ. 2014. 67f. il. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Evolução)- Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

Melanooides tuberculata (Müller, 1774), an exotic freshwater snail of Afro-Asiatic origin, was first recorded to Vila do Abraão, Ilha Grande, Angra dos Reis, Rio de Janeiro, in 2005. It acts as first intermediate host for trematodes of medical importance. The populations are mostly composed by parthenogenetic females that have a brood-pouch, where occurs the development of the juveniles. The objectives were to verify the presence of males; to check if there are fluctuations in the production of eggs and juveniles along time, to determine when sexual maturity is reached and to check for parasites and relate their presence with the number of eggs and juveniles. To count eggs and juveniles, we used females collected bimonthly from September/07 to October 07/10, separated into four classes according to the diameter of the shell: Class I: < 3mm; Class II: 3 to 5.99mm; Class III: 6 to 8.99mm; Class IV: > 9mm. We selected five females/class, totaling 20 females/collect, except for the samples of September/07 (16 specimens), April/09 (19 specimens) and April/10 (13 specimens), totaling 348 females. To observe parasites, eggs and juveniles, the molluscs had the roof of the cavity and brood-pouch dissected. The juveniles were separated into classes according to the number of shell whorls: less than two whorls, with two to four whorls, and more than four whorls. The data was analyzed using an Excel spreadsheet and the statistic package SYSTAT 12. For histology of gonad and brood-pouch, five specimens of each of the four size classes, collected monthly from September/12 to February/13 were used, totaling 20 specimens/collect except to the sample from October/12, with 16 specimens since only one specimen from Class IV was found. The specimens were fixed in Carson's Millonig formalin, decalcified with EDTA, embedded in paraffin and stained with hematoxylin and eosin. We found 16 males. We count 24.694 eggs and 31.474 youngs in total, showing the following averages: Class I: 0 eggs and 0.31 juveniles, Class II: 24.19 eggs and 47.56 juveniles, Class III: 114.84 eggs and 155.78 juveniles, Class IV: 146.76 eggs and 158.41 juveniles. The Kruskal-Wallis test showed that there are significant variation in the number of eggs and juveniles along the year ($p < 0.01$ for eggs and juveniles). It was found a significant difference between the number of eggs and juveniles according to different shell size classes ($p < 0.01$ for both). We count 27.877 juveniles with less than two whorls, 3.251 with two to four whorls and 346 juveniles with more than four whorls. We found 111 females parasitized by *Centrocestus formosanus* (Nishigori, 1924) out of 348 females (32% of total). The Mann-Whitney test showed that the parasitized females presented a smaller number of eggs and juveniles compared to the non-parasitized ($p < 0.01$ for both). The Mann-Whitney test excluding females from Class 1 show the same result with $p < 0.01$ for both. We conclude that the population of *M. tuberculata* from Vila do Abraão isn't composed only by females; the females reproduce during all the year, because eggs and juveniles were found in all the field surveys, and larger females have more eggs and, on average, more juveniles in the brood-pouch; the reproductive maturity should begin with approximately 3mm shell diameter, because we observed late vitelogenic oocytes in the ovary and that parasitism affects negatively *M. tuberculata*, reducing the number of eggs and juveniles formed.

Keywords: *Melanooides tuberculata*. Trematodes. Parthenogenesis. Ilha Grande. Rio de Janeiro.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Concha de <i>Melanoides tuberculata</i> (Müller, 1774).....	14
Figura 2 -	Fêmea de <i>Melanoides tuberculata</i> (Müller, 1774) dissecada.....	16
Figura 3-	Glândula digestiva de um macho de <i>Melanoides tuberculata</i> (Müller, 1774).....	17
Figura 4-	Distribuição conhecida de <i>Melanoides tuberculata</i> (Müller, 1774).....	22
Figura 5-	Mapa da Ilha Grande mostrando sua localização no estado do Rio de Janeiro e em destaque a Vila do Abraão.....	27
Figura 6-	Imagem de satélite da Vila do Abraão, Ilha Grande, RJ.....	28
Figura 7-	Riacho da Vila do Abraão, Ilha Grande, Rio de Janeiro, Brasil, onde foram coletados os espécimes de <i>Melanoides tuberculata</i> (Müller, 1774) utilizados neste estudo.....	29
Figura 8-	Concha de <i>Melanoides tuberculata</i> (Müller, 1774).....	31
Figura 9-	Classes de tamanho de <i>Melanoides tuberculata</i> (Müller, 1774).....	31
Figura 10-	Fêmea de <i>Melanoides tuberculata</i> (Müller, 1774).....	32
Figura 11-	Concha de <i>Melanoides tuberculata</i> (Müller, 1774).....	32
Figura 12-	Inclusão dos espécimes de <i>Melanoides tuberculata</i> (Müller, 1774) em blocos de parafina.....	34
Figura 13-	Montagem de lâminas com Goma de Damar.....	35
Figura 14-	Brânquia <i>Poecilia reticulata</i> Peters, 1859 contendo metacercárias.....	36
Figura 15-	<i>Melanoides tuberculata</i> (Müller, 1774).....	37
Figura 16-	Total de machos de <i>Melanoides tuberculata</i> (Müller, 1774) encontrados em cada uma das 18 coletas realizadas em um riacho impactado na Vila do Abraão, Ilha Grande, Angra dos Reis, RJ.....	38

Figura 17-	Total de ovos e juvenis de <i>Melanooides tuberculata</i> (Müller, 1774) contabilizados em cada coleta bimestral realizada em um riacho impactado da Vila do Abraão, Ilha Grande, Angra dos Reis, RJ, de set/2007 a out/2010.....	39
Figura 18-	Média de ovos e de juvenis contabilizados por fêmea de <i>Melanooides tuberculata</i> (Müller, 1774) em cada estação chuvosa e seca, do ano de 2007 ao ano de 2010 em um riacho impactado da Vila do Abraão, Ilha Grande, Angra dos Reis, RJ.....	40
Figura 19-	Total de ovos e juvenis de <i>Melanooides tuberculata</i> (Müller, 1774) encontrados em cada classe de tamanho de concha procedentes de um riacho impactado da Vila do Abraão, Ilha Grande, Angra dos Reis, RJ, coletados de set/2007 a out/2010.....	41
Figura 20-	Média de ovos e juvenis de <i>Melanooides tuberculata</i> (Müller, 1774) encontrados em cada classe de tamanho de concha procedentes de um riacho impactado da Vila do Abraão, Ilha Grande, Angra dos Reis, RJ, coletados de set/2007 a out/2010.....	41
Figura 21-	Média de ovos de <i>Melanooides tuberculata</i> (Müller, 1774) por classe de tamanho de concha em cada coleta bimestral realizada em um riacho impactado na Vila do Abraão, Ilha Grande, Angra dos Reis, Rio de Janeiro, coletados de set/2007 a out/2010.....	42
Figura 22-	Média de juvenis de <i>Melanooides tuberculata</i> (Müller, 1774) por classe de tamanho de concha em cada coleta bimestral realizada em um riacho impactado na Vila do Abraão, Ilha Grande, Angra dos Reis, Rio de Janeiro, coletados de set/2007 a out/2010.....	42
Figura 23-	Média de ovos e juvenis diferentes tamanhos de <i>Melanooides tuberculata</i> (Müller, 1774) em cada coleta bimestral realizada em um riacho impactado da Vila do Abraão, Ilha Grande, Angra dos Reis, Rio de Janeiro, coletados de set/2007 a out/2010.....	43
Figura 24-	Porcentagem de ovos e juvenis de diferentes tamanhos de <i>Melanooides tuberculata</i> (Müller, 1774), procedentes de um riacho da Vila do Abraão, Ilha Grande, Angra dos Reis, RJ, coletados de set/2007 a out/2010.....	44
Figura 25-	Porcentagem de ovos e juvenis de diferentes tamanhos de <i>Melanooides tuberculata</i> (Müller, 1774), em cada classe de tamanho de concha (da Classe I a Classe IV), coletados em um riacho impactado da Vila do Abraão, Ilha Grande, Angra dos Reis, Rio de Janeiro.....	44
Figura 26-	Cercária do tipo Pleurolofocerca.....	45
Figura 27-	Porcentagem de fêmeas parasitadas e não parasitadas de <i>Melanooides tuberculata</i> (Müller, 1774) em cada coleta bimestral realizada em um riacho impactado da Vila do Abraão, Ilha Grande, Angra dos Reis, RJ, de set/2007 a out/2010.....	46

Figura 28-	Fêmea não parasitada e parasitada de <i>Melanoïdes tuberculata</i> (Müller, 1774).....	47
Figura 29-	Número de fêmeas parasitadas e não parasitadas de <i>Melanoïdes tuberculata</i> (Müller, 1774) em cada classe de tamanho de concha (da Classe I a Classe IV).....	47
Figura 30-	Total de ovos e juvenis nas fêmeas parasitadas e não parasitadas da Classe II a Classe IV.....	48
Figura 31-	Metacercária de <i>Centrocestus formosanus</i> (Nishigori,1924).....	49
Figura 32-	<i>Centrocestus formosanus</i> (Nishigori, 1924).....	49
Figura 33-	<i>Melanoïdes tuberculata</i> (Müller, 1774) da Classe I (A,B) e da Classe II (C-F).....	51
Figura 34-	<i>Melanoïdes tuberculata</i> (Müller, 1774) da Classe II.....	52
Figura 35-	<i>Melanoïdes tuberculata</i> (Müller, 1774) da Classe III (C).....	53
Figura 36-	<i>Melanoïdes tuberculata</i> (Müller, 1774) da Classe IV.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Data das coletas e a estação (seca ou chuvosa).....	30
Tabela 2-	Total de machos de <i>Melanoides tuberculata</i> (Müller, 1774) em cada classe de tamanho.....	38

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	14
1	OBJETIVOS.....	26
1.1	Objetivo geral.....	26
1.2	Objetivos específicos.....	26
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	27
2.1	Área de Estudo.....	27
2.2	Material utilizado para contagem de ovos e juvenis.....	29
2.3	Análises estatísticas dos dados referentes à contagem de ovos e juvenis.....	33
2.4	Processamento histológico	33
2.5	Identificação específica do parasito.....	35
3	RESULTADOS.....	37
3.1	Proporção entre machos e fêmeas.....	37
3.2	Variação no número de ovos e juvenis ao longo dos três anos trabalhados.	39
3.3	Variação no número de ovos e juvenis entre as classes de tamanho.....	40
3.4	Ocorrência de diferentes fases de desenvolvimento no marsúpio.....	43
3.5	Número de ovos e juvenis em fêmeas parasitadas e não parasitadas.....	45
3.6	Identificação específica do parasito.....	49
3.7	Análise histológica do ovário e do marsúpio de <i>Melanoides tuberculata</i> (Müller, 1774)	50
3.8	Observação da presença de parasitos através das lâminas histológicas de <i>Melanoides tuberculata</i> (Müller, 1774)	54
4	DISCUSSÃO.....	55
4.1	Proporção entre machos e fêmeas.....	55
4.2	Variação no número de ovos e juvenis ao longo dos três anos trabalhados.	55
4.3	Variação no número de ovos e juvenis entre as classes de tamanho.....	56
4.4	Ocorrência de diferentes fases de desenvolvimento no marsúpio.....	57
4.5	Fêmeas parasitadas e não parasitadas.....	57
4.6	Identificação específica do parasito.....	58

4.7	Análise Histológica do ovário e do marsúpio de <i>Melanoides tuberculata</i>	58
	(Müller, 1774)	
	CONCLUSÃO.....	60
	REFERÊNCIAS.....	61

INTRODUÇÃO

Características da espécie

Melanooides tuberculata (Müller, 1774) é uma espécie partenogenética incluída na família Thiaridae (Mollusca: Gastropoda: Caenogastropoda: Cerithioidea), a qual compreende predominantemente gastrópodes marinhos, com invasão secundária dos ambientes estuarinos e límnicos (MORRISON, 1954).

Melanooides tuberculata apresenta concha moderadamente grossa, cônica (turriforme), espiralada, estreita e com ápice frequentemente desgastado (Figura 1) pela ação do ácido carbônico presente na água (BRANDT, 1974, POINTIER *et al.*, 1992, SIMONE, 2001). Benthem-Jutting (1956) diz que a espécie apresenta de 30 a 35 mm de altura, de 10 a 12 mm de diâmetro e de 8 a 10 mm de altura da abertura, Brandt (1974) informa somente os valores de altura e diâmetro de concha que variam de 22 a 42 mm e de 7 a 14 mm, respectivamente. As voltas são convexas ou quase planas, crescendo regularmente em tamanho. O umbílico é fechado. O perióstraco é amarronzado, amarelado ou oliváceo (BRANDT, 1974). O óstraco apresenta coloração bege claro com esparsas bandas axiais marrons escuras, chamadas de flâmulas por Facon *et al.* (2003). A abertura é oval (BENTHEM-JUTTING, 1956) sem um canal sifonal claro (SIMONE, 2001). O opérculo é córneo (BENTHEM- JUTTING, 1956), escuro, elíptico, núcleo subterminal (pauciespiral), fechando toda a abertura e apresenta uma cicatriz elíptica interna próxima a margem interna (SIMONE, 2001).

Figura 1- Concha de *Melanooides tuberculata* (Müller, 1774)



Legenda: Escala= 1 cm
 Nota: Espécime coletado
 em um riacho da
 Vila do Abraão,
 Ilha Grande.
 Foto: A autora, 2014.

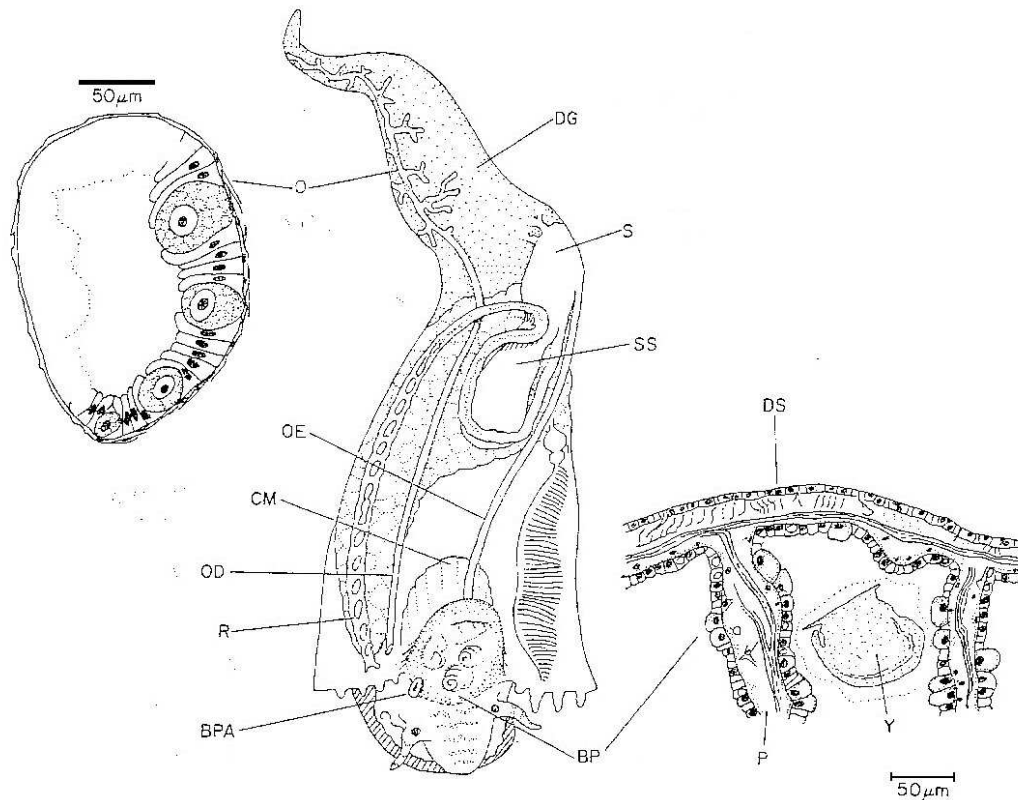
O pé e a cabeça apresentam coloração escura, com manchas coalescentes na região anterior da cabeça e nas regiões dorsais do pé. A probóscide é ampla, achatada dorsoventralmente e possui margem anterior bilobada. Os tentáculos possuem o mesmo comprimento da probóscide. Os olhos são escuros, próximos à base do tentáculo e sem ommatóforos (SIMONE, 2001).

A rádula é curta, em formato de “S”. Os dentes raquidianos apresentam sete cúspides cada, os dentes laterais com cinco cúspides cada, sendo a segunda mais larga, os dentes marginais possuem cinco cúspides cada (SIMONE, 2001). A rádula é do tipo tenioglossa, cuja fórmula radular é 2.1.1.1.2 (BENTHEM-JUTTING, 1956). Brandt (1974) fornece a fórmula radular com a indicação do número de dentículos em cada dente, sendo esta C 4-1-4, L 1-1-4, M₁ 9, M₂ 10.

O bordo do manto é franjado (BENTHEM-JUTTING, 1956, BRANDT, 1974). O osfrádio é semelhante a um sulco, com aproximadamente metade do comprimento da brânquia, situado posteriormente ao seu início. O espaço entre a brânquia e o reto é estreito. O reto é largo e amplo. O ânus é sifonado (SIMONE, 2001).

Melanoides tuberculata é uma espécie dióica, ou seja, apresenta machos e fêmeas, apesar de ser uma espécie predominantemente partenogenética. As fêmeas possuem um sistema reprodutivo simples, similar ao descrito para *Thiara granifera* (Lamarck, 1816) em Abbott (1952) e é composto por ovário, oviduto palial e marsúpio (Figura 2) (BERRY e KADRI, 1974).

Figura 2- Fêmea de *Melanoides tuberculata* (Müller, 1774) dissecada.



Legenda: BP, marsúpio, BPA, abertura do marsúpio, CM, músculo columelar, DG, glândula digestiva, DS, superfície dorsal, O, ovário, OD, oviduto, OE, esôfago, P, trabéculas do marsúpio, R, reto, S, estômago, SS, saco do estilete, Y, juvenil.

Fonte: BERRY e KADRI, 1974

Os machos dificilmente são encontrados e, quando estão presentes, eles apresentam gônada e espermatozóides (HODGSON e HELLER, 1990). Heller e Farstay (1989) relatam que os machos vivos possuem gônada grande e vermelha (Figura 3), quase do tamanho da glândula digestiva. Estes dados contradizem Brandt (1974) que afirma que o sistema reprodutor dos machos não apresenta gônada funcional.

Figura 3- Glândula digestiva de um macho de *Melanoides tuberculata* (Müller, 1774).



Legenda: Seta branca indicando gônada masculina de *Melanoides tuberculata* (Müller, 1774), com tamanho similar ao da glândula digestiva. Espécime coletado em um riacho da Vila do Abraão, Ilha Grande.

Foto: A autora, 2012.

Com relação ao sistema reprodutor das fêmeas de *M. tuberculata*, o ovário apresenta uma coloração amarela e se encontra ao longo da região posterior, parcialmente inserido na glândula digestiva (BERRY e KADRI, 1974, HELLER e FARSTAY, 1989). Ele é estreito, ramificado e não contém grande número de ovócitos (BERRY e KADRI, 1974).

O oviduto palial é totalmente fechado, sendo um tubo estreito com paredes grossas (SIMONE, 2001). O oviduto palial é diferente de quase todos os outros gastrópodes, sendo um duto simples, contínuo e não glandular que se continua a partir do ovário até atingir uma abertura próxima ao ânus e da abertura renal (BERRY e KADRI, 1974).

O marsúpio é uma câmara espaçosa, localizado na região anterodorsal do corpo e dorsal ao esôfago, com paredes finas. Ele é visível externamente como uma protuberância atrás dos tentáculos e da massa bucal. O marsúpio é posteriormente bilobado, sendo o lobo esquerdo largo e longo. Internamente possui uma superfície suave e é dividido por partições

de tecido muscular em um número de compartimentos irregulares. Normalmente encontra-se no marsúpio de *M. tuberculata* juvenis em todas as fases de desenvolvimento (BERRY e KADRI, 1974, DUDGEON, 1986, SIMONE, 2001, BEM-AMI e HODGSON, 2005), de ovos até juvenis de cinco a seis voltas (BERRY e KADRI, 1974). Não há evidência da presença de células nutritivas associadas ao marsúpio, sugerindo que juvenis maiores poderiam canibalizar ovos e juvenis menores dentro do marsúpio (DUDGEON, 1986). A abertura do marsúpio é um pequeno poro, às vezes semelhante a papilas, na região direita da ao lado da cabeça e acima da massa pediosa, próximo ao músculo columelar (SIMONE, 2001).

O marsúpio de *M. tuberculata* contrasta com o marsúpio palial mais comum entre os mesogastrópodes vivíparos de acordo com Berry e Kadri (1974), pois é uma expansão do oviduto palial.

Histologia do sistema reprodutor de *Melanoides tuberculata*

Sistema reprodutor feminino

O ovário raramente excede 210 μm e os poucos ovócitos desenvolvidos alcançam a dimensão máxima de 50 x 53 μm , com um núcleo largo e nucléolo distinto, mas com pouco vitelo. Células foliculares envolvem completamente os poucos ovócitos jovens. Ovócitos largos crescem e ultrapassam células do folículo e suas pontas ficam expostas ao lúmen do ovário. Esferas de vitelo se coram em rosa pela hematoxilina, ocorrem dentro de ovócitos e normalmente ocupam muito do lúmen do ovário seccionado e do oviduto. O ovário é delimitado por um tecido conjuntivo que inclui algumas fibras musculares (BERRY e KADRI, 1974, SILVA e SIMOES, 1989). O epitélio germinativo ocupa toda extensão do ovário (SILVA e SIMOES, 1989).

O oviduto palial apresenta uma única camada de epitélio colunar curto ciliado com aproximadamente 10 μm de altura e é cercado por um fino tecido conjuntivo com algumas fibras musculares circulares (BERRY e KADRI, 1974).

O marsúpio apresenta uma parede que consiste em uma única camada de células epiteliais, que se apoiam na lamina basal. Abaixo desta lamina, está uma região de músculo liso e tecido conjuntivo. A parede do marsúpio se estende como uma série de finas trabéculas para o lúmen da câmara, que por isso se torna particionada em uma série de compartimentos abertos. Cada compartimento pode carregar embriões de diferentes tamanhos. As trabéculas são compostas principalmente de músculo liso e tecido conjuntivo, também próximo a parede

do marsúpio se encontra uma única camada de células epiteliais que cobrem cada trabécula. O epitélio que faz o revestimento é não ciliado e as células, em sua maioria, são pequenas (6-10 µm). A maioria das células epiteliais apresenta poucas microvilosidades. Os embriões apesar de associados as trabéculas, não estavam conectados a elas (BEN-AMI e HODGSON, 2005).

Sistema reprodutor masculino

Silva e Simões (1989), em trabalho realizado com cerca de 50 indivíduos adultos da espécie *M. tuberculata* de Panorama, SP e com o intuito de identificar a presença de machos dentre os animais coletados, observaram que a gônada dos machos é formada por diversos ácinos os quais apresentam um grande número de células germinativas em diferentes fases da espermatogênese. Não encontraram espermatozóides nos dutos eferentes, embora tenham encontrado grande quantidade em diferentes etapas de maturação nos ácinos. Figuras meióticas, em diferentes fases foram encontradas.

Livshits e Fishelson (1983) observaram testículo, próstata e vaso deferente. O testículo se estende ao longo das voltas viscerais, embutido na glândula digestiva. A próstata é revestida por um epitélio secretor e a partir dela se estende o vaso deferente.

Ciclo de vida e ciclo reprodutivo

A partenogênese na espécie teria resultado de uma evolução adaptativa a partir de populações isoladas da África e da Ásia (DUDGEON, 1986). A reprodução sexuada existe em *M. tuberculata*, porém resulta num menor número de embriões (BEN-AMI e HELLER, 2005).

A partenogênese no ciclo de vida de *M. tuberculata* provavelmente facilita a rápida exploração de habitats recém-colonizados, já que toda uma população pode surgir de apenas uma fêmea. Presumivelmente as vantagens da partenogênese superam as desvantagens da pouca recombinação genética (DUDGEON, 1986). Uma dessas vantagens seria a melhora na retenção de adaptações favoráveis e rápida difusão destas na população. Este tipo de reprodução também é favorável em ambientes com pouca variação ambiental ou pouco estressantes.

Embora Berry e Kadri (1974), Dudgeon (1986) e Livshits e Fishelson (1983) tenham se referido a *M. tuberculata* e outros gastrópodes como sendo vivíparos, não está claro se

usaram o termo em seu senso estrito ou de uma forma geral, que incluía viviparidade e ovoviviparidade. Viviparidade implica que os embriões em crescimento dependam de nutrição contínua da mãe (BEN-AMI e HODGSON, 2005). Segundo Benthem–Jutting (1956), Brandt (1974) e Ben-Ami e Hodgson (2005), a nutrição dos juvenis no marsúpio pouco depende da fêmea. Segundo Ben-Ami e Hodgson (2005), viviparidade verdadeira não ocorre em *M. tuberculata*, sendo o termo ovoviviparidade mais adequado a ser usado para descrever o desenvolvimento dessa espécie, assim como para outros gastrópodes, até que seja obtida uma prova de viviparidade.

Possivelmente levando em conta a concha alta e estreita típica dos Cerithiacea, o marsúpio de *M. tuberculata* causa menos obstrução para o fluxo de água que entra na cavidade do manto em relação ao marsúpio palial. Morrison (1954) sugere que, como os marsúpios de Thiaridae e Planaxidae são similares em complexidade, estas duas famílias deveriam estar intimamente relacionadas (HOUBRICK, 1987).

Dudgeon (1989) fez um trabalho com três espécies de tiarídeos: *Thiara scabra* (Müller, 1774), *M. tuberculata* e *Brotia hainanensi* (Brot, 1872). Segundo o autor, as três espécies têm vida curta, sendo que uma pequena parcela da população sobrevive a mais de um evento reprodutivo, sendo essencialmente semélparos, com uma pequena proporção de indivíduos iteróparos (DUDGEON, 1989).

Dudgeon (1986) estimou o tempo de vida de *M. tuberculata* em dois anos, a partir de observações de campo. Elkarmi e Ismail (2007) estimou o tempo de vida máxima em cinco anos e Pointier *et al.* (1992) observou o mesmo tempo de vida com base em estudos laboratoriais.

Segundo Berry e Kadri (1974) *M. tuberculata* oriundos da Malásia se reproduzem durante o ano todo e os caramujos sexualmente maduros apresentam juvenis em todos os estágios de desenvolvimento no marsúpio durante todas as estações do ano. Entretanto, não se sabe se a liberação de juvenis na Malásia é contínua ou flutua durante um ciclo anual (DUDGEON, 1986). Caramujos mantidos em laboratório por Berry e Kadri (1974) liberaram juvenis a uma taxa variável. O mesmo experimento mostrou que a contínua exposição a longos períodos no escuro inibiam a liberação de juvenis. Dudgeon (1986) informa que em Hong Kong, de modo semelhante ao que acontece com os *M. tuberculata* malaios, os caramujos sexualmente maduros apresentam juvenis em todos os estágios de desenvolvimento no marsúpio durante todas as estações. Também diz que é interessante a presença de juvenis completamente formados no marsúpio de *M. tuberculata* durante o ano em Hong Kong, já que existe um único período de liberação de juvenis em grandes números, correspondendo ao

verão, pois no inverno não há liberação de juvenis. Ismail e Arif (1993) informam que num deserto dos Emirados Árabes Unidos, foram encontrados dois períodos de liberação de juvenis.

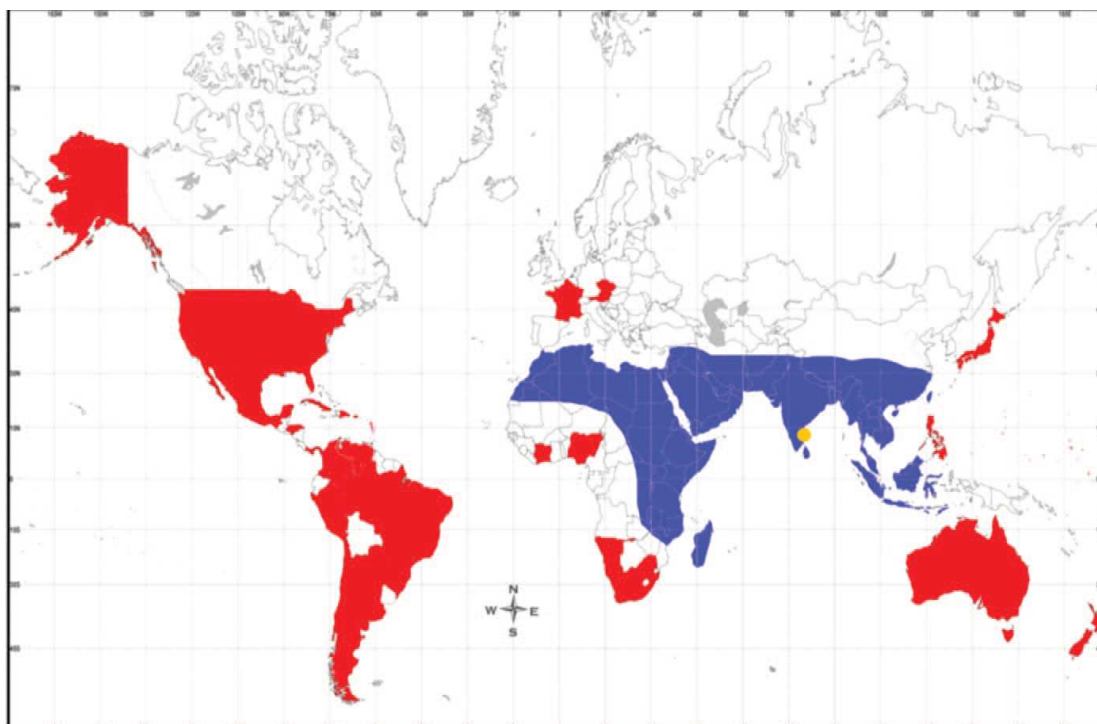
A liberação dos juvenis pode estar sob o controle das fêmeas, que só permitem que os juvenis movam-se lentamente para fora do marsúpio quando as condições do ambiente favorecem a sobrevivência destes ou representam um risco para vida da fêmea (DUDGEON, 1986). A alta produtividade e a presença de juvenis completamente desenvolvidos dentro do marsúpio durante todo o ano, também são adaptações para colonização rápida de habitats (DUDGEON, 1986).

Distribuição

Melanoides tuberculata é um molusco exótico, nativo do sudeste asiático, norte e leste da África e ilhas do Indo-Pacífico, com ampla distribuição nessas áreas (PILSBRY e BEQUAERT, 1927). A localidade-tipo da espécie indicada por Müller (1774) é na costa Coromandel, no sudeste da Índia. Atualmente a espécie está distribuída na região tropical e subtropical segundo Madsen e Fradsen (1989), Pointier (1993), Pointier, (1999) e Giovanelli *et al.* (2005).

O primeiro registro de *M. tuberculata* no continente americano foi nos Estados Unidos, por volta de 1963 e, em seguida, expandiu-se para América Central (ABOTT, 1973, DUNDEE e PAINE, 1977). Também foram encontrados registros da introdução de *M. tuberculata* na Nova Zelândia (DUGGAN, 2002), no Havaí, e em ilhas do Caribe, Ilhas Martinica (POINTIER, 2001), Santa Lúcia (POINTIER e JOURDANE, 2000) e Guadalupe (POINTIER *et al.* 1993). Miyahira (2010) aponta o registro de *M. tuberculata* em outros 44 países. Ao todo há registro de *M. tuberculata* para 55 países, sendo 25 dentro da área de distribuição da espécie e 30 fora (Figura 4).

Figura 4- Distribuição conhecida de *Melanooides tuberculata* (Müller, 1774).



Mapa: I.C. Miyahira, 2012.

Legenda: Em azul , área de distribuição original, em vermelho, áreas invadidas, segundo dados da literatura. Em amarelo, a provável localidade-tipo

Fonte: LIVRO MOLUSCOS LÍMNICOS INVASORES, 2012.

No Brasil, o primeiro registro de *M. tuberculata* foi em Santos (SP), em torno de 1967, quando um membro da Sociedade Brasileira de Malacologia, residente em Santos e proprietário de uma indústria de artefatos de conchas, recebeu de um fornecedor numerosos melanídeos vivos, coletados em local indeterminado do município santista (VAZ *et al.* 1986). Este autor comenta que provavelmente foi introduzida pelo comércio aquarista. Desde então, foi encontrado em Brasília, Espírito Santo, Minas Gerais, Goiás, Paraíba e Rio de Janeiro (THIENGO *et al.* 1998, 2001, 2002a, 2002b, GIOVANELLI *et al.* 2001), além dos registros na Região Nordeste (CARVALHO, 1986, FREITAS *et al.* 1987, PAZ *et al.* 1995, DE MARCO JÚNIOR, 1999, FERNANDEZ *et al.* 2001, GUIMARÃES *et al.* 2001, VIANA *et al.* 2004) e na Região Sul. Atualmente, há registro de *M. tuberculata* em 18 estados brasileiros (Pará, Tocantins, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Sergipe, Bahia, Mato Grosso, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina) e no Distrito Federal (FERNANDEZ *et al.* 2003, THIENGO *et al.* 2007, SOUTO *et al.* 2011).

O primeiro registro de *M. tuberculata* em área insular no Brasil foi para a Ilha Grande (Angra dos Reis, RJ) em 2005, quando pequenas populações foram encontradas na Vila do Abraão, talvez como consequência do despejo de água de aquário (SANTOS *et al.* 2007). A

introdução recente desta espécie oferece uma oportunidade única para o monitoramento de espécies introduzidas e para uma melhor compreensão do processo de invasão, pois neste caso foi observado o processo de invasão desde o início (SANTOS *et al.* 2007). Puth e Post (2005) afirmam que trabalhos de bioinvasão que abordem os estágios iniciais de invasão com dados empíricos são raros.

Importância médica-veterinária

Boaventura *et al.* (2002) investigaram as formas larvais de trematódeos provenientes de gastrópodes límnicos da microrregião Rio de Janeiro, verificando que espécimes de *M. tuberculata* foram coletados nos municípios de Guapimirim e Maricá, estando infectados por cercárias do tipo *Pleurolofocerca* 21,1% e 0,65%, respectivamente. Bógea *et al.* (2005) encontraram o mesmo tipo cercariano infectando *M. tuberculata* coletados em Vargem Pequena, Vargem Grande e Prainha, todas essas localidades no município do Rio de Janeiro. Ximenes (2011) também encontrou cercárias do tipo *Pleurolofocerca* em *M. tuberculata* na Vila do Abraão, Ilha Grande.

Dechruksa *et al.* (2007) encontraram dois tipos de cercárias em *M. tuberculata* de Krek River, Tailândia: xiphidiocercaria e cercárias do tipo *Pleurolofocerca*. A xiphidiocercaria era de *Loxogenoides bicolor* Krull, 1933, um trematódeo que parasita anfíbios (GIBSON, 1996) e as cercárias do tipo *Pleurolofocerca* correspondia a *H. pumilio*, um trematódeo que apresenta como primeiros hospedeiros intermediários moluscos, como segundos hospedeiros intermediários peixes e apresenta aves como hospedeiros definitivos, mas também pode infectar mamíferos e répteis (UMADEVI e MADHAVI, 2006). Eles também relataram que *C. formosanus* também apresenta esse tipo de cercária, porém esse trematódeo não foi encontrado em *M. tuberculata* no trabalho realizado por eles.

A presença de *M. tuberculata* no Brasil é de importância para os sanitaristas, pois o caramujo é o primeiro hospedeiro intermediário de vários trematódeos, alguns dos quais parasitam o homem, como *Clonorchis sinensis* (Cobbold, 1875) (VAZ *et al.* 1986, DERRAIK, 2008), *Paragonimus westermani* (Kerbert, 1878) (VAZ *et al.* 1986, GUIMARÃES *et al.* 2001, DERRAIK, 2008), *Haplorchis pumilio* (Looss, 1896) (UMADEVI e MADHAVI, 2006, DERRAIK, 2008, DÍAZ *et al.* 2008), *Philophthalmus distomatosa* (Looss, 1896) (RADEV *et al.* 2000, DERRAIK, 2008), *Paragonimus kellicotti* Ward, 1908 (PROCTOR e GREGORY, 1974, GUIMARÃES *et al.* 2001, DERRAIK, 2008), *Philophthalmus gralli* Mathis e Leger,

1910 (DERRAIK, 2008, PINTO e MELO, 2010b) e *Centrocestus formosanus* (Nishigori, 1924) (POINTIER, 1999, LEVY, 2004, DERRAIK, 2008, PINTO e MELO, 2010a). *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) (DERRAIK, 2008, IBRAHIM, 2007), que é um nematódeo da família Metastrongylidae, também parasita *M. tuberculata*, mas nesse caso, o caramujo é o único hospedeiro intermediário.

Os ciclos de vida de trematódeos digenéticos envolvem uma série de estágios larvais, como miracídio, esporocisto, rédia, cercária e metacercária, que se desenvolvem em um ou mais hospedeiros intermediários, antecedendo a fase adulta (SCHELL, 1970).

As espécies do gênero *Paragonimus* Braun, 1899, responsáveis pela paragonomíase, apresentam crustáceos (caranguejo ou lagosta) como segundos hospedeiros intermediários (WHO, 1995, PROCOP *et al.* 2009). Devido à ausência do segundo hospedeiro intermediário, que é um caranguejo de água doce, *P. westermani* não tem a possibilidade de instalar-se no Brasil (VAZ *et al.* 1986), pois o homem se infecta pela ingestão do caranguejo cru ou mal cozido contaminado com metacercárias encistadas (estágio infectante do verme) (JHAYYA *et al.* 2000).

A doença provocada pelo *C. sinensis*, a clonorquíase, pode ocorrer no Brasil devido à presença de várias espécies de peixes da família Cyprinidae, segundo hospedeiro intermediário deste parasito e também pela aquisição do hábito de comer peixes crus, costume proveniente de países asiáticos (VAZ *et al.* 1986), contendo metacercárias. Leite *et al.* (1989) identificou imigrantes asiáticos infectados com este parasito.

Os trematódeos do gênero *Centrocestus* Looss, 1899 são pequenos parasitos intestinais de aves e mamíferos descritos principalmente do continente asiático (PINTO, 2009). *Centrocestus formosanus*, o helminto responsável pela centrocestíase, tem como segundos hospedeiros intermediários vários peixes de água doce, dentre eles os da família Cyprinidae (AGUILAR-AGUILAR *et al.* 2009). Apresenta ciclo biológico envolvendo tiarídeos e peixes como hospedeiros intermediários. No Brasil, *C. formosanus* foi registrado pela primeira vez parasitando *M. tuberculata* por Pinto e Melo (2010a) na Lagoa da Pampulha, em Minas Gerais.

Haplorchis pumilio também tem como segundo hospedeiro intermediário, peixes de água doce (UMADEVI e MADHAVI, 2006) e como hospedeiros definitivos aves, mamíferos (dentre eles o homem) e ocasionalmente répteis. A infecção também ocorre pela ingestão de peixe cru ou mal cozido (DÍAZ *et al.* 2008).

Espécies do gênero *Philophthalmus* Looss, 1899 parasitam os olhos de aves, que são seus hospedeiros definitivos (WAIKAGUL *et al.* 2006, DERRAIK *et al.* 2008), podendo

infectar ocasionalmente o homem e outros animais (PINTO *et al.* 2005, WAIKAGUL *et al.* 2006, DERRAIK *et al.* 2008), através do contato direto com os olhos ou por via oral (WAIKAGUL *et al.* 2006, DERRAIK *et al.* 2008).

Angiostrongylus cantonensis (Nematoda) parasita pulmões de ratos (hospedeiro definitivo), infectando o homem acidentalmente através da ingestão de larvas em terceiro estágio presentes em caracóis ou lesmas (hospedeiro intermediário) mal cozidos, rãs ou sapos (hospedeiro paratênico) mal cozidos e vegetais contaminados (LAI *et al.* 2007, SLOM *et al.* 2002). A doença provocada por *A. cantonensis* é a meningite eosinofílica (AGUIAR *et al.* 1981, SLOM *et al.* 2002, IBRAHIM, 2007).

Melanoides tuberculata é susceptível a infecções por larvas de trematódeos, mas apesar disso o conhecimento sobre a sazonalidade da infecção não é aprofundado. A taxa de infecção sazonal dos caramujos pode ser afetada por vários fatores, como a disponibilidade de hospedeiros definitivos, sazonalidade na população de caramujos e o ciclo de vida do parasito. Portanto, diferentes parasitos podem apresentar diferentes padrões de sazonalidade (ISMAIL e ARIF, 1993).

Relevância

O estudo da biologia reprodutiva de *M. tuberculata* pode ajudar a compreender melhor os processos de invasão associados a essa espécie, pois apenas uma fêmea pode dar origem a uma população, devido à partenogênese (DUDGEON, 1986). O estudo também ajuda a entender a interferência dos parasitos na biologia reprodutiva de *M. tuberculata*, como foi observado por Ximenes (2011), onde a infecção parasitária pela cercária do tipo *Pleurolofocerca* provocou redução no número de juvenis no marsúpio. Um alto risco de infecção parasitária, de acordo com a Hipótese da Rainha Vermelha, deveria favorecer a reprodução sexuada, porém Ben-Ami e Heller (2005) verificaram que a partenogênese prevaleceu mesmo em populações de *M. tuberculata* com altas taxas de infecção. Outro fato que destaca a relevância do estudo é tratar-se de uma introdução recente no riacho da Vila do Abraão, uma vez que a compreensão das fases iniciais das introduções é importante para a compreensão geral do processo de introdução biológica.

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo Geral

Aumentar o conhecimento sobre *M. tuberculata* no Brasil, através de um estudo sobre a biologia reprodutiva e parasitologia desta espécie na Vila do Abraão, Ilha Grande.

1.2 Objetivos específicos

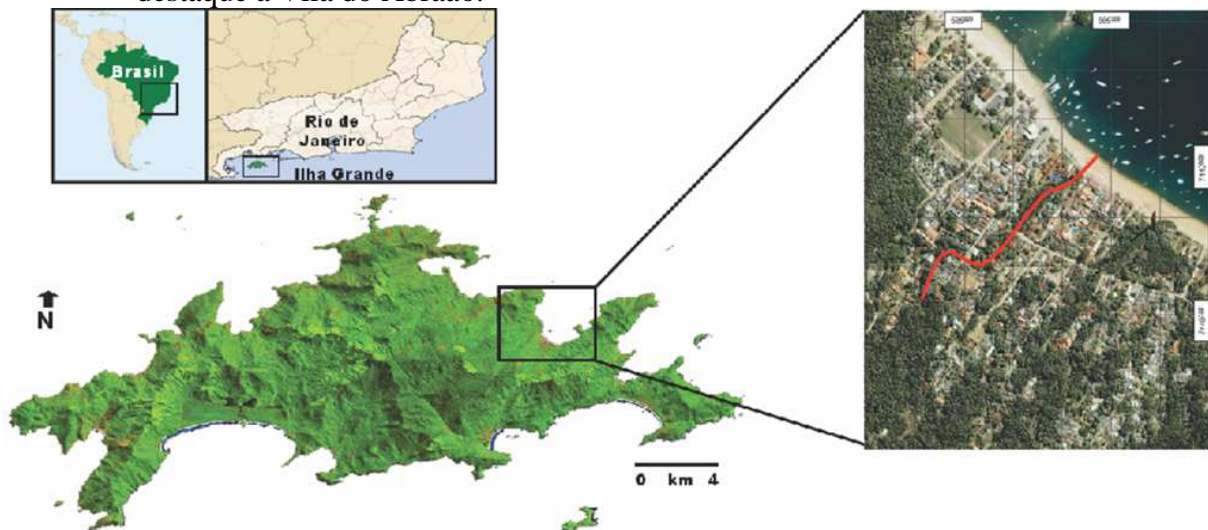
- 1)** Verificar a existência de machos e a proporção deles entre os espécimes analisados,
- 2)** Verificar se existem flutuações na produção de ovos e juvenis ao longo do tempo,
- 3)** Verificar quando a maturidade sexual é atingida,
- 4)** Verificar a existência de parasitos nos animais analisados,
- 5)** Relacionar a presença de parasitos com o número de ovos e juvenis formados.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Área de estudo

As coletas foram realizadas em um riacho localizado na Vila do Abraão, Ilha Grande, Angra dos Reis (Figura 5), em sua porção final, que corre em área de planície. A escolha do trecho feita em função da presença de *Melanoides tuberculata*, identificada em um trabalho prévio (SANTOS *et al.* 2007). O trecho do riacho estudado (aproximadamente 250 m) foi dividido em oito trechos de aproximadamente 30 m cada, denominados pontos de coleta (P1 ao P8) (Figura 6). Os pontos de coleta são contínuos, assim que acaba o P1, se inicia o P2 e assim por diante. Este riacho é de pequeno porte com cerca de um a quatro metros de largura e profundidade média em torno de 20 cm. Canais com até 80 cm de profundidade formam-se nas margens, dependendo das chuvas, as quais aumentam a vazão, provocando acúmulo de sedimentos em alguns pontos. Apresenta margens retificadas e vegetação marginal reduzida (Figura 7), sendo esta composta principalmente por plantas exóticas, entre elas jaqueiras e bananeiras, além de gramíneas e vegetação herbácea. Poucas plantas aquáticas são encontradas neste riacho, principalmente nos pontos mais a montante. O riacho recebe esgoto de origem doméstica e também há descarte de restos de cozinha (cascas de frutas e legumes, alimentos cozidos, ossos) pelos moradores de suas margens (MIYAHIRA, 2010).

Figura 5- Mapa da Ilha Grande mostrando sua localização no estado do Rio de Janeiro e em destaque a Vila do Abraão.



Legenda: A linha vermelha indica o trajeto do riacho estudado.

Fonte: I.C. Miyahira, 2010

Figura 6- Imagem de satélite da Vila do Abraão, Ilha Grande, RJ.



Legenda: Riacho delimitado em azul e os pontos de coleta indicados com suas respectivas coordenadas geográficas.

Fonte: Google Earth , MIYAHIRA, 2010.

Figura 7- Riacho da Vila do Abraão, Ilha Grande, Rio de Janeiro, Brasil, onde foram coletados os espécimes de *Melanoides tuberculata* (Müller, 1774) utilizados neste estudo.



Legenda: P8 (A), P3(B).

Nota: Nas fotos podem ser observados os impactos ocorrentes neste riacho como margens retificadas, vegetação ciliar e espécies vegetais exóticas.

Foto: I.C. Miyahira, [2011?].

2.2 Material utilizado para contagem de ovos e juvenis

Os animais utilizados procedem do projeto “Dinâmica populacional de *Melanoides tuberculata* (Müller, 1774) em um riacho impactado da Vila do Abraão, Ilha Grande, Angra dos Reis, RJ, Brasil”, que ocorre desde julho/2006 (MIYAHIRA, 2010). Os animais utilizados já se encontravam fixados em álcool 70°GL. Foram utilizados lotes procedentes das coletas de setembro/2007, novembro/2007, janeiro/2008, março/2008, maio/2008, julho/2008, setembro/2008, dezembro/2008, fevereiro/2009, abril/2009, junho/2009, setembro/2009, novembro/2009, fevereiro/2010, abril/2010, junho/2010, agosto/2010 e outubro/2010 perfazendo três anos de acompanhamento (Tabela 1). As coletas eram bimestrais, exceto quando surgia algum imprevisto, como por exemplo, falta de vaga no Centro de Estudos Ambientais e Desenvolvimento Sustentável (CEADS-UERJ) para pernoite, sendo a coleta realizada no mês seguinte ao que deveria ter sido realizada a coleta.

A metodologia de coleta era constituída da procura pelos moluscos por três coletores por 15 minutos, com auxílio de concha de captura de moluscos, perfazendo um esforço total de 45 minutos por ponto de coleta (MIYAHIRA, 2010). Todos os moluscos encontrados foram acondicionados em potes de plástico com pouca quantidade de água (o suficiente para

manutenção da umidade) e transportados para o laboratório, onde posteriormente foi feita a curadoria do material (MIYAHIRA, 2010).

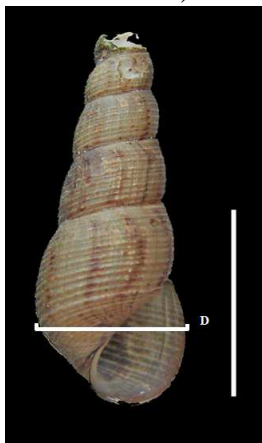
Tabela 1- Data das coletas e a estação (seca ou chuvosa).

Data das coletas	Estação
setembro/2007	Seca
novembro/2007	Chuvosa
janeiro/2008	Chuvosa
março/2008	Chuvosa
maio/2008	Seca
julho/2008	Seca
setembro/2008	Seca
dezembro/2008	Chuvosa
fevereiro/2009	Chuvosa
abril/2009	Seca
junho/2009	Seca
setembro/2009	Seca
novembro/2009	Chuvosa
fevereiro/2010	Chuvosa
abril/2010	Chuvosa
junho/2010	Seca
agosto/2010	Seca
outubro/2010	Seca

Nota: Tabela contendo a data das coletas realizadas em um riacho impactado na Vila do Abraão, Ilha Grande, Angra dos Reis, RJ e a estação (seca ou chuvosa).

Os animais utilizados estavam separados por classes de tamanho de acordo com o diâmetro da concha (Figura 8), pois em *M. tuberculata* a porção apical da concha é desgastada (BENTHEM-JUTTING, 1956, BRANDT, 1974). Devido a esse desgaste, o diâmetro é a melhor medida para representar o desenvolvimento do animal. Dudgeon (1986) usa a mesma abordagem.

Figura 8—Concha de *Melanoides tuberculata* (Müller, 1774).



Legenda: D- diâmetro.
Escala= 1cm.
Nota: Foto ilustrando como foi medido o diâmetro da concha
Foto: I. C. Miyahira, 2010.

Figura 9- Classes de tamanho de *Melanoides tuberculata* (Müller, 1774).



Legenda: Da esquerda para a direita- Classe I, Classe II, Classe III e Classe IV.

Nota: Seqüência de crescimento (da direita para a esquerda) de *Melanoides tuberculata* (Müller, 1774) da Vila do Abraão, Ilha Grande.

Foto: MIYAHIRA, 2010

Seguindo o proposto por Miyahira (2010) utilizamos quatro classes de tamanho baseadas no diâmetro da concha. Os animais da Classe I apresentavam concha de 0,01 a 2,99 mm de diâmetro, os da Classe II de 3,00 a 5,99 mm de diâmetro, os da Classe III de 6,00 a 8,99 mm de diâmetro e os da Classe IV de 9,00 mm ou mais de diâmetro da concha (Fig.9).

A escolha das classes de tamanho está relacionada à biologia da espécie. Os indivíduos da Classe I são os animais que ainda não reproduzem, de acordo com Dudgeon (1989) que indica o diâmetro de 3,5 mm (Classe II) como sendo o tamanho inicial para a reprodução. A partir da Classe II seriam animais que já entraram em estágio reprodutivo. Os indivíduos da Classe III são animais adultos e os da Classe IV, animais senis que alcançaram a segunda época reprodutiva (DUDGEON, 1989).

Para as análises, foram separados aleatoriamente cinco animais de cada classe de tamanho, sendo 20 animais em cada coleta, com exceção de três coletas: a de setembro /2007

com 16 animais, a de abril/2009 com 19 animais e a de abril/2010 com 13 animais. Desta forma temos um total de 348 espécimes.

Os animais, imersos em álcool 70°GL e com auxílio de estereomicroscópio, tiveram o marsúpio dissecado para a contagem de ovos e juvenis fosse feita. A dissecação foi feita através de um corte que abrange a região do marsúpio próxima à cabeça e o lado direito do marsúpio, sendo o teto do marsúpio rebatido (Figura 10), com isso os juvenis foram retirados. A contagem deles foi feita também sob estereomicroscópio e os mesmos foram separados por tamanho em três grupos, de acordo com o número de voltas, segundo Berry e Kadri (1974). O primeiro grupo reúne juvenis com menos de duas voltas (< 2 voltas), o segundo agrupa juvenis com duas a quatro voltas (2 a 4 voltas) (Figura 11) e o terceiro reúne juvenis com mais de quatro voltas (> 4 voltas).

Os mesmos animais dissecados foram verificados quanto à presença de trematódeos, através da observação do marsúpio, da parede da cavidade palial e da glândula digestiva. Quando os parasitos eram encontrados, eram fixados em FAA (Formol, Álcool e Ácido Acético). O número de parasitos não foi quantificado.

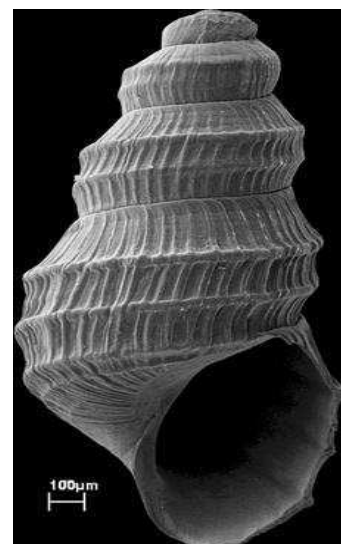
Figura 10- Fêmea de *Melanooides tuberculata* (Müller, 1774).



Nota: Espécime coletado em um riacho impactado na Vila do Abraão, Ilha Grande, com marsúpio aberto contendo juvenis.

Foto: A autora, 2013.

Figura 11 – Concha de *Melanooides tuberculata* (Müller, 1774).



Nota : Fotografia eletrônica de varredura. Caracterização do juvenil de *Melanooides tuberculata* (Müller, 1774) com quatro voltas, oriundo da Vila do Abraão, Ilha Grande.

Fonte: MIYAHIRA, 2010.

2.3 Análises estatísticas dos dados referentes à contagem de ovos e juvenis

Os dados referentes ao número de ovos e juvenis não apresentaram distribuição normal, segundo o teste de Shapiro-Wilk. Os mesmos dados apresentaram distribuição assimétrica e isso foi constatado através do Skewness pelo Erro Padrão de Skewness. Devido a isso foram utilizados testes não-paramétricos. A diferença no número de ovos e juvenis entre as classes de tamanho e entre as expedições foi testada com Teste de Kruskal-Wallis (ZAR, 1998). A diferença no número de ovos e juvenis na presença e na ausência de parasitos (rédias e cercárias) foi avaliada através do teste de Mann-Whitney (ZAR, 1998). A diferença no número de fêmeas parasitadas entre estação chuvosa e seca foi verificada com o Teste T, pois através do Teste de Shapiro-Wilk foi constada a distribuição normal dos dados. As análises foram feitas usando planilha Excel e o programa estatístico SYSTAT 12.

2.4 Processamento histológico

Para a histologia da gônada e do marsúpio, foram utilizados cinco exemplares recém-coletados das quatro classes de tamanho, de setembro de 2012 a fevereiro de 2013, totalizando 20 espécimes por coleta, exceto pela coleta de outubro de 2012, na qual apenas 16 espécimes foram coletados, pois apenas um indivíduo da Classe IV foi encontrado. Os animais tiveram as conchas perfuradas e em seguida foram imersos em Millonig de Carson durante 24 horas e depois colocados em EDTA, para que fosse feita a descalcificação da concha. O tempo de imersão no EDTA variou, dependendo do tamanho e da dureza da concha, ou seja, quanto maior o espécime e quanto mais dura a sua concha, o tempo para descalcificação era maior.

Foi utilizado um processamento adaptado para moluscos. O material foi lavado em água corrente durante uma hora, passou por um processo de desidratação, com banhos sucessivos de Etanol (20°GL, 30 °GL e 70 °GL), cada banho com duração de 30 minutos. Em seguida, passou por banhos sucessivos de Álcool Isobutílico Absoluto, com duração de 40 minutos, 30 minutos e uma hora. O material imerso nas substâncias anteriormente citadas estava em constante agitação.

Durante o procedimento de inclusão, os espécimes permaneceram imersos em parafina durante 30 minutos e depois em parafina a vácuo durante uma hora, sendo incluídos em blocos de parafina logo em seguida (Figura 12). Após a inclusão, foram feitos cortes de 5 µm em micrótomo.

Figura 12- Inclusão dos espécimes de *Melanoides tuberculata* (Müller, 1774) em blocos de parafina.



Nota: Inclusão no Histocentre 2 dos espécimes de *Melanoides tuberculata* (Müller, 1774), coletados em um riacho impactado na Vila do Abraão.

Foto: T.C.B. Silva, 2013.

Os cortes foram desparafinizados (3 banhos de Xilol durante 3 minutos) e hidratados (3 banhos de álcool absoluto, um banho em álcool 95 °GL e um banho em álcool 70 °GL) até a água destilada.

Em seguida os cortes ficaram imersos em Hematoxilina de Mayer durante 20 minutos e diferenciados em água corrente durante 25 minutos logo em seguida.

Os cortes foram desidratados com um banho de álcool 70 °GL durante 3 minutos. Em seguida foram imersos em Eosina-Floxina durante dois minutos.

Os cortes foram lavados rapidamente em álcool 95 °GL, durante 1 minuto. Depois foram desidratados em três banhos de álcool absoluto de três minutos cada e, em seguida, clarificados em três banhos de xilol. Após estes procedimentos, as laminas foram montadas utilizando Goma de Damar (Figura 13). Após a secagem das laminas, elas foram etiquetadas. As etiquetas apresentavam número de identificação da lamina e a coloração utilizada, que foi Hematoxilina - Eosina.

Figura 13- Montagem de lâminas com Goma de Damar.



Foto: J.M.S. Ferro, 2013.

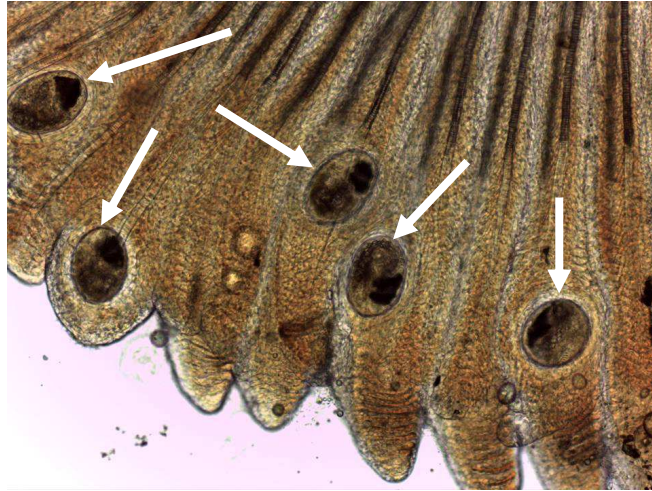
As lâminas foram analisadas em microscópio óptico Axio Home e as imagens foram feitas com a Axio Cam com o auxílio do programa Axio Visio LE, ambos da Zeiss.

2.5 Identificação específica do parasito

Foram enviados espécimes de *M. tuberculata* à equipe do Professor Dr Alan Lane de Melo do Laboratório de Taxonomia e Biologia de Invertebrados da Universidade Federal de Minas Gerais, para ser realizada infecção experimental de hospedeiros mantidos em laboratório, com o objetivo de caracterizar os estágios de desenvolvimento e efetuar a identificação específica do parasito.

Amostras de cercárias do tipo *Pleurolofocerca* obtidas dos moluscos foram utilizadas para a infecção de *Poecilia reticulata* Peters, 1859. As metacercárias foram recuperadas das brânquias destes peixes (Figura 14) após 30 dias e administradas por via oral a exemplares de camundongos da linhagem AKR/J.

Figura 14– Brânquia *Poecilia reticulata* Peters, 1859 contendo metacercárias.



Legenda: Setas brancas indicando as metacercárias na brânquia.

Nota: Metacercárias obtidas nas brânquias de *Poecilia reticulata* Peters, 1859 após infecção experimental por cercárias do tipo *Pleurolofoerca*, emergidas de exemplares de *Melanoides tuberculata* (Müller, 1774), naturalmente infectados, coletados da Vila do Abraão, Ilha Grande.

Foto: H.A. Pinto, 2013.

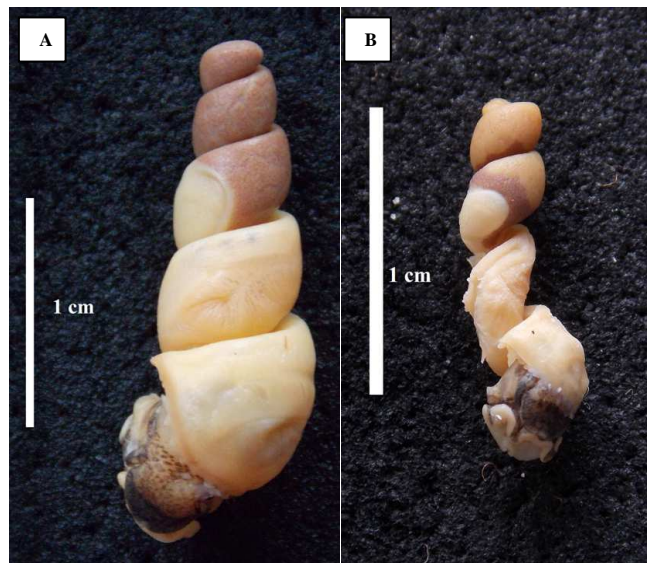
Após uma semana de infecção, os roedores foram mortos por deslocamento cervical e os parasitos adultos recuperados no intestino delgado. Os estágios de desenvolvimento obtidos foram examinados em microscópio de luz e comparados com amostras do parasito obtidas em outras localidades do Brasil.

3 RESULTADOS

3.1 Proporção entre machos e fêmeas

Verificamos dentre os 348 espécimes analisados, a presença de 16 machos (Figura 15 B e Figura 16). Os machos foram substituídos por fêmeas (Figura 15 A) da mesma coleta e classe de tamanho, para que fossem feitas as análises estatísticas. Esses animais identificados como machos além de não possuírem juvenis, não possuíam marsúpio e apesar de já estarem fixados no álcool, foi possível ver a presença da gônada masculina quase do mesmo tamanho da glândula digestiva e de coloração diferente, característica de um macho (HELLER e FARSTAY, 1989). Não foram observados parasitos nos machos. Ao todo foram analisados 364 espécimes (348 fêmeas e 16 machos).

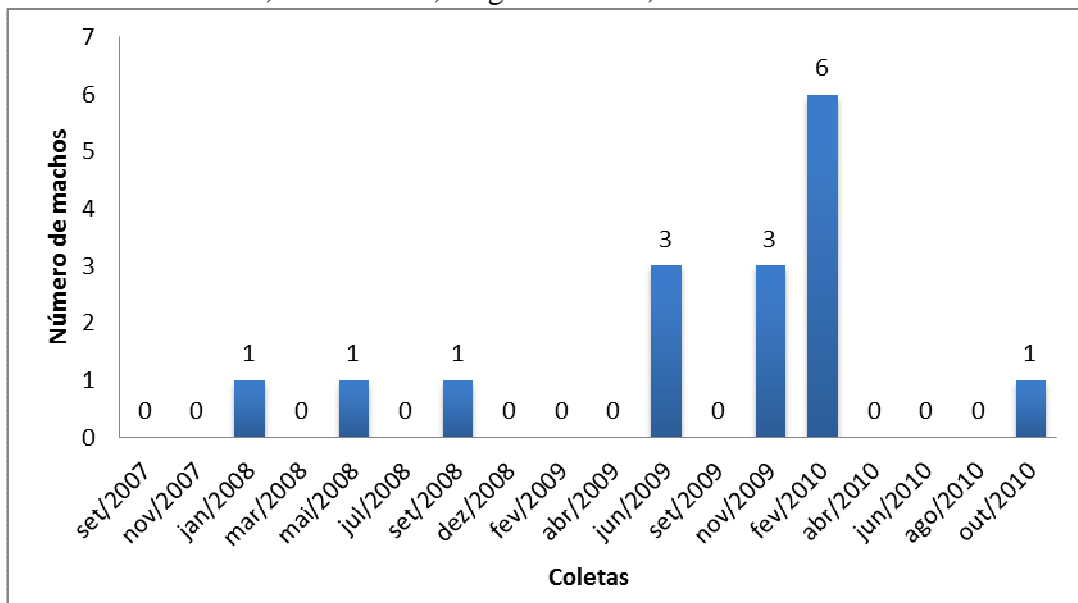
Figura 15- *Melanoides tuberculata* (Müller, 1774)



Legenda: (A) - Fêmea , (B) - Macho. O macho já estava fixado e por isso a gônada não apresentou a coloração vermelha.

Foto: A autora, 2014.

Figura 16- Total de machos de *Melanoides tuberculata* (Müller, 1774) encontrados em cada uma das 18 coletas realizadas em um riacho impactado na Vila do Abraão, Ilha Grande, Angra dos Reis, RJ.



Analisando o número de machos por classe de tamanho, observamos que a classe de tamanho que apresentou mais machos foi a Classe II, enquanto que não observamos nenhum macho pertencente a Classe IV (Tabela 2).

Tabela 2- Total de machos de *Melanoides tuberculata* (Müller, 1774) em cada classe de tamanho.

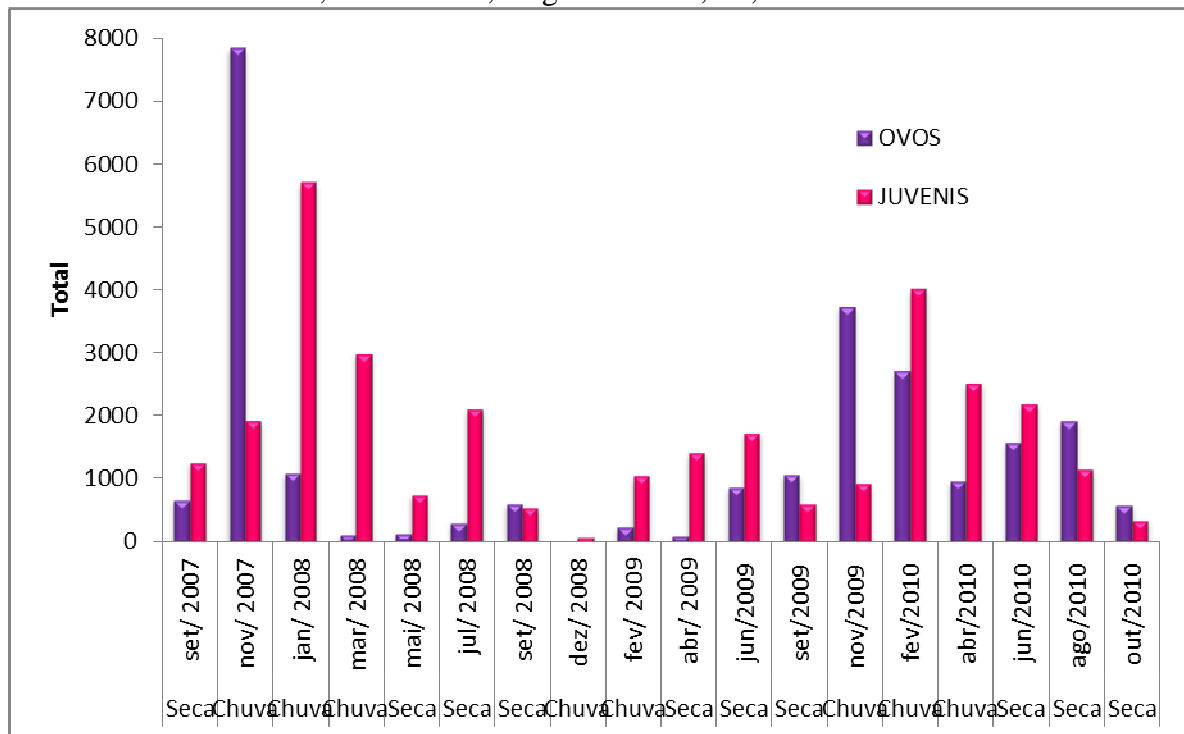
	Quantidade de machos
Classe I- 0,01 a 2,99 mm	2
Classe II- 3,00 a 5,99 mm	11
Classe III- 6,00 a 8,99 mm	3
Classe IV- a partir de 9, 00 mm	0

Nota: Espécimes coletados em um riacho impactado na Vila do Abraão, Ilha Grande, Angra dos Reis, RJ. As coletas foram realizadas bimestralmente de set/2007 a out/2010.

3.2 Variação no número de ovos e juvenis ao longo dos três anos trabalhados

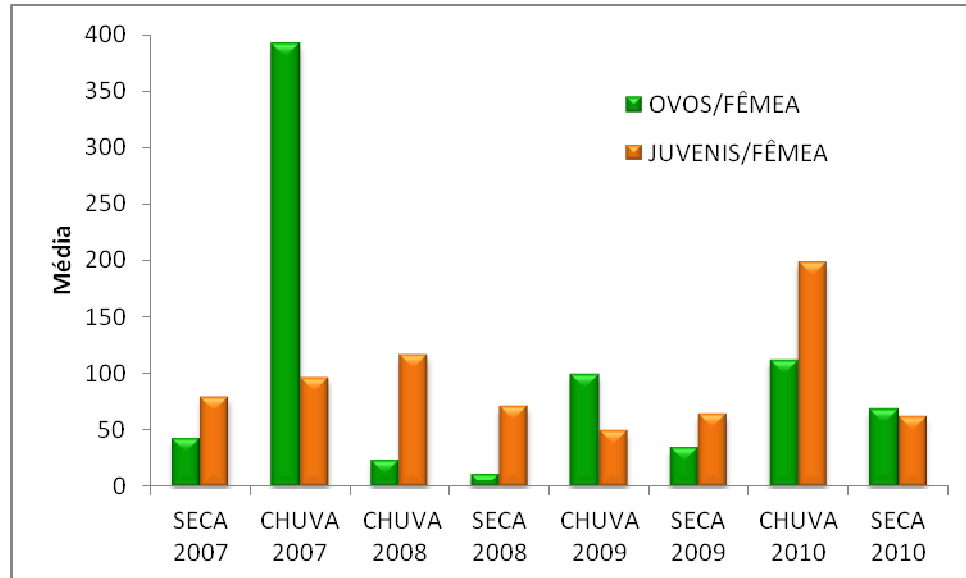
Encontramos ovos e juvenis em *M. tuberculata* nas 18 coletas, sendo contabilizados ao todo 24.694 ovos e 31.474 juvenis. A coleta de novembro/2007 foi a que apresentou o maior número de ovos (7858) e a coleta de janeiro/2008 foi a que apresentou o maior número de juvenis (5720) (Figura 17). Verificamos que existe variação no número de ovos e juvenis e esta variação é significativa como indicado pelo Teste de Kruskal-Wallis, com valor de $p < 0,01$ para ovos e para juvenis.

Figura 17- Total de ovos e juvenis de *Melanoides tuberculata* (Müller, 1774) contabilizados em cada coleta bimestral realizada em um riacho impactado da Vila do Abraão, Ilha Grande, Angra dos Reis, RJ, de set/2007 a out/2010.



Calculando a média de ovos e juvenis por fêmea em cada estação, observamos que a estação chuvosa de 2007 foi a que apresentou maior média de ovos e que a estação chuvosa de 2010 foi a que apresentou maior média de juvenis (Figura 18).

Figura 18- Média de ovos e de juvenis contabilizados por fêmea de *Melanoides tuberculata* (Müller, 1774) em cada estação chuvosa e seca, do ano de 2007 ao ano de 2010 em um riacho impactado da Vila do Abraão, Ilha Grande, Angra dos Reis, RJ.



3.3 Variação no número de ovos e juvenis entre as classes de tamanho

As fêmeas da Classe I não apresentaram ovos em todas as coletas e não apresentaram juvenis em 17 das 18 coletas e, dentre as 85 fêmeas analisadas dessa classe, apenas duas apresentaram juvenis. As duas maiores classes de tamanho, a Classe III e a Classe IV, foram as que apresentaram maior total e maior média de ovos e juvenis no marsúpio, a Classe IV apresentou a maior média, o maior total de ovos e o maior total de juvenis, a Classe III apresentou o maior total de juvenis (Figura 19 e Figura 20). Com exceção dos animais pertencentes à Classe I, em que a maioria das fêmeas não apresentou ovos e/ou juvenis, 67 fêmeas apresentaram mais de 50 ovos, 117 fêmeas apresentaram mais de 50 juvenis e 57 fêmeas apresentaram mais de 50 ovos e juvenis.

Figura 19- Total de ovos e juvenis de *Melanooides tuberculata* (Müller, 1774) encontrados em cada classe de tamanho de concha procedentes de um riacho impactado da Vila do Abraão, Ilha Grande, Angra dos Reis, RJ, coletados de set/2007 a out/2010.

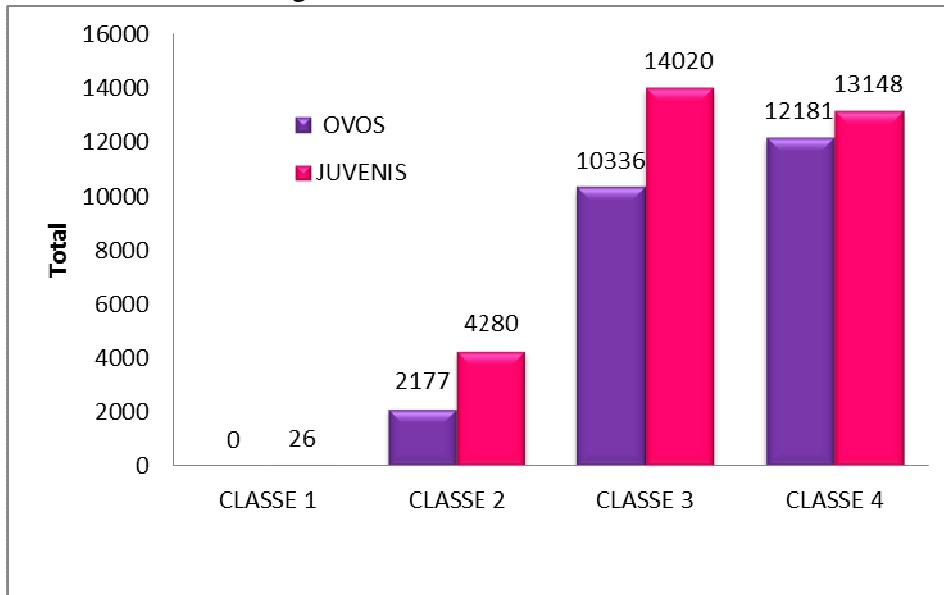
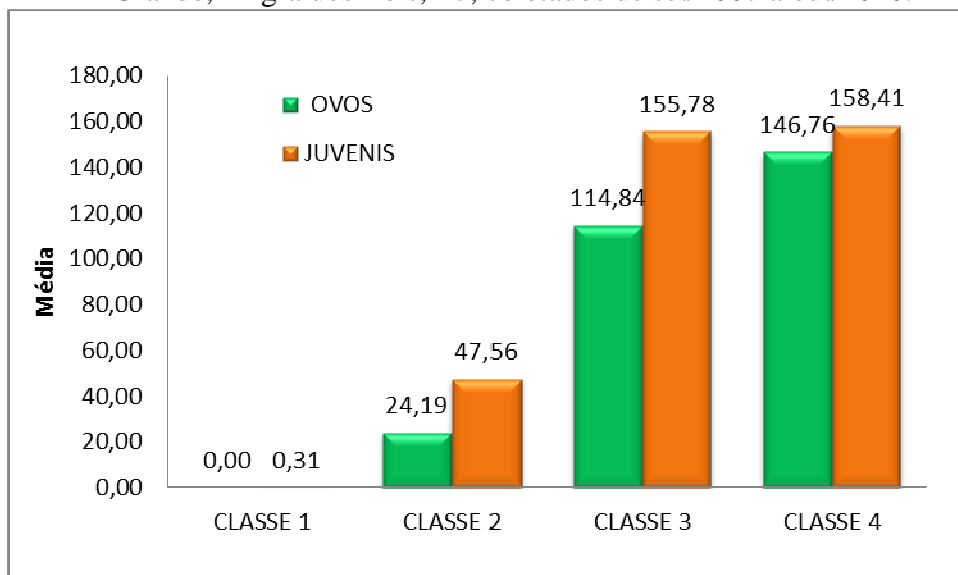


Figura 20- Média de ovos e juvenis de *Melanooides tuberculata* (Müller, 1774) encontrados em cada classe de tamanho de concha procedentes de um riacho impactado da Vila do Abraão, Ilha Grande, Angra dos Reis, RJ, coletados de set/2007 a out/2010.

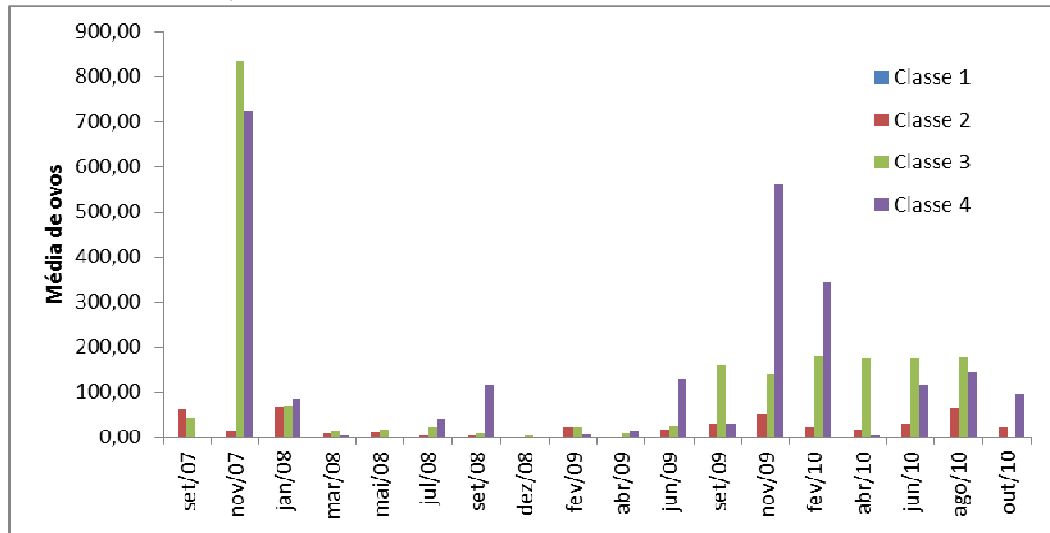


O Teste de Kruskal-Wallis demonstrou que há diferença significativa entre o número de ovos e de juvenis entre as classes de tamanho de concha, com valor de $p < 0,01$ tanto para ovos quanto para juvenis.

Em relação a cada coleta amostrada, as classes de tamanho III e IV foram as que apresentaram maior média de ovos na maioria das coletas. A média de ovos na Classe III foi

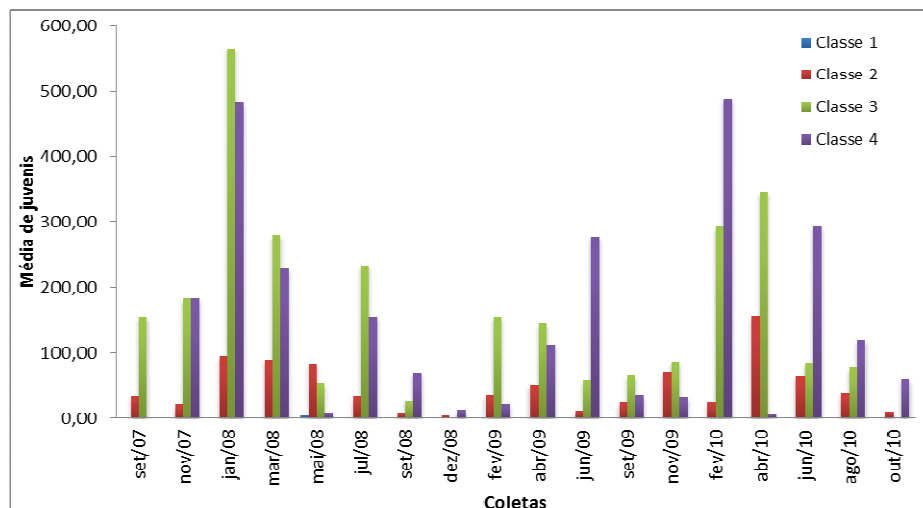
maior que nas demais classes de tamanho em sete das 18 coletas (Figura 21). A média de ovos na Classe IV foi maior que nas demais classes de tamanho em 8 das 18 coletas (Figura 21).

Figura 21– Média de ovos de *Melanoides tuberculata* (Müller, 1774) por classe de tamanho de concha em cada coleta bimestral realizada em um riacho impactado na Vila do Abraão , Ilha Grande, Angra dos Reis, Rio de Janeiro, coletados de set/2007 a out/2010.



Assim como a média de ovos, as classes de tamanho III e IV foram as que apresentaram maior média de número de juvenis na maioria das coletas (Figura 22). A média de juvenis na Classe III foi maior que nas demais classes de tamanho em nove das 18 coletas (Figura 22). A média de juvenis na Classe IV foi maior em sete das 18 coletas (Figura 22).

Figura 22– Média de juvenis de *Melanoides tuberculata* (Müller, 1774) por classe de tamanho de concha em cada coleta bimestral realizada em um riacho impactado na Vila do Abraão, Ilha Grande, Angra dos Reis, Rio de Janeiro, coletados de set/2007 a out/2010.



3.4 Ocorrência de diferentes fases de desenvolvimento no marsúpio

Juvenis em todos os estágios de desenvolvimento foram encontrados no marsúpio. Foram contabilizados 24.694 ovos, 27.877 juvenis com menos de duas voltas, 3.251 juvenis com duas a quatro voltas e 346 juvenis com mais de quatro voltas. As médias de ovos e juvenis com menos de duas voltas foram maiores que as médias dos juvenis com duas a quatro voltas e com mais de quatro voltas em todas as coletas (Figura 23). Os ovos e juvenis com menos de duas voltas, juntos, representam 93% de tudo que foi contabilizado nos marsúpios durante o trabalho (Figura 24).

Figura 23- Média de ovos e juvenis diferentes tamanhos de *Melanoides tuberculata* (Müller, 1774) em cada coleta bimestral realizada em um riacho impactado da Vila do Abraão, Ilha Grande, Angra dos Reis, Rio de Janeiro, coletados de set/2007 a out/2010.

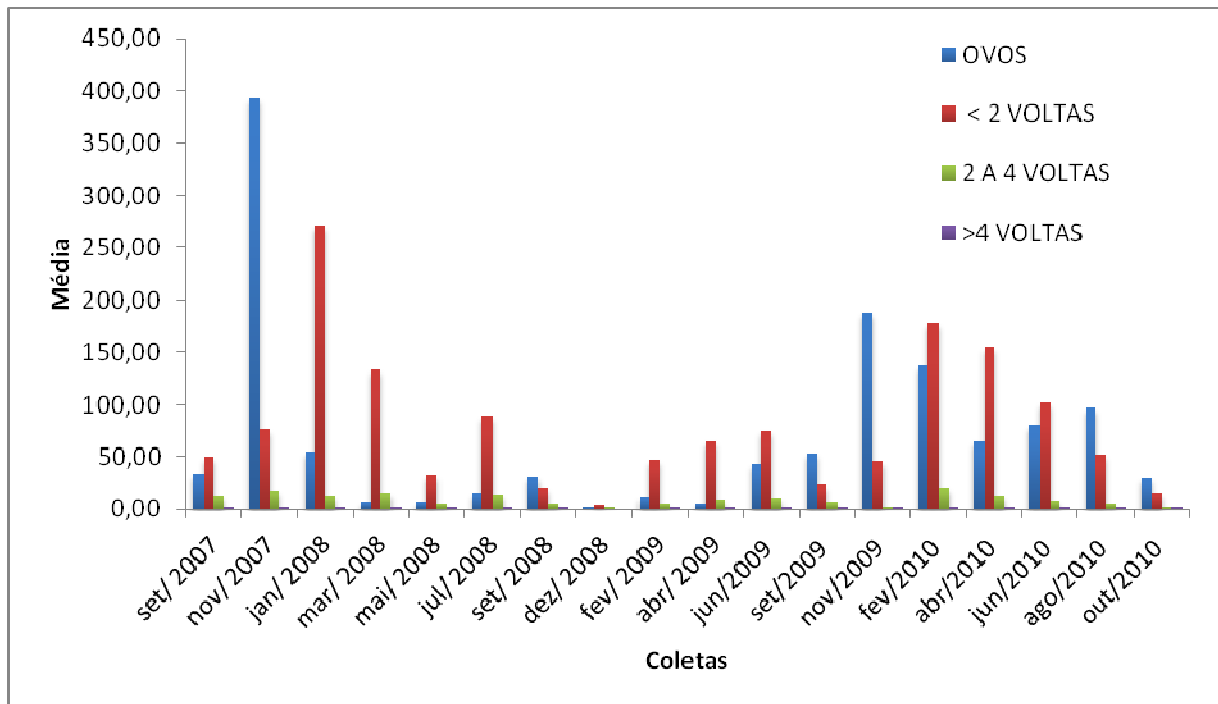
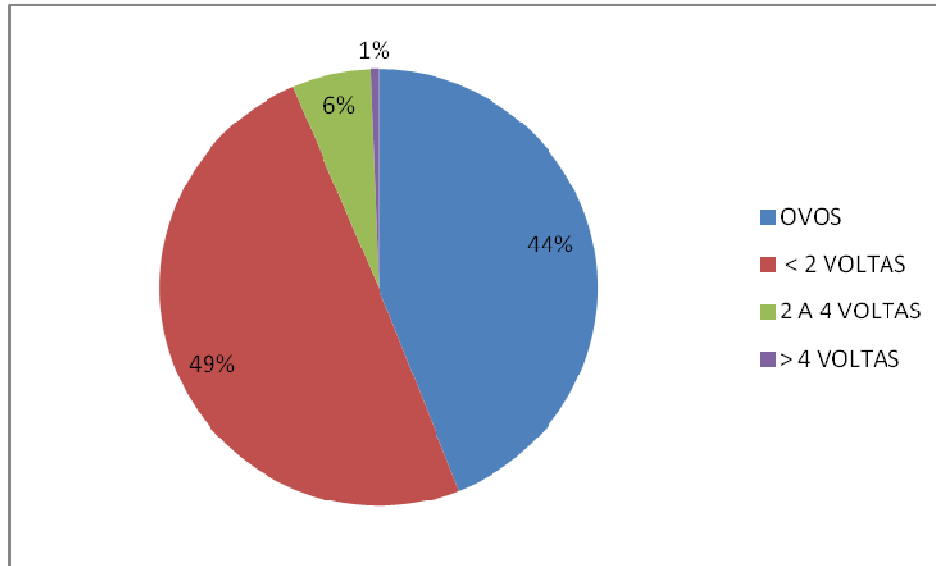
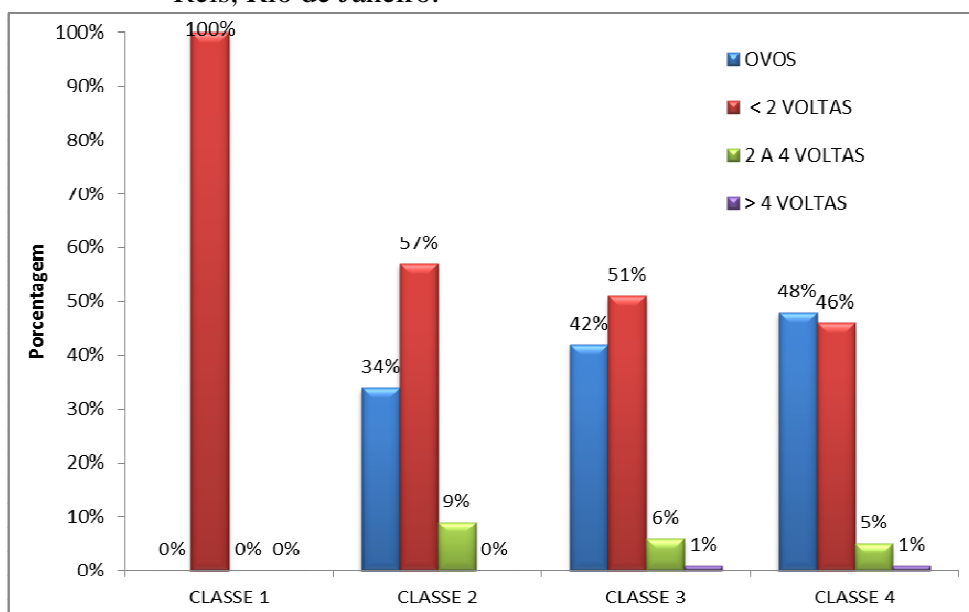


Figura 24- Porcentagem de ovos e juvenis de diferentes tamanhos de *Melanoides tuberculata* (Müller, 1774), procedentes de um riacho da Vila do Abraão, Ilha Grande, Angra dos Reis, RJ, coletados de set/2007 a out/2010.



Os juvenis com menos de duas voltas representaram mais de 50% do que foi contabilizado no marsúpio da Classe I a Classe III (Figura 25). Na Classe IV tanto os ovos quanto os juvenis com menos de duas voltas representaram mais de 40%.

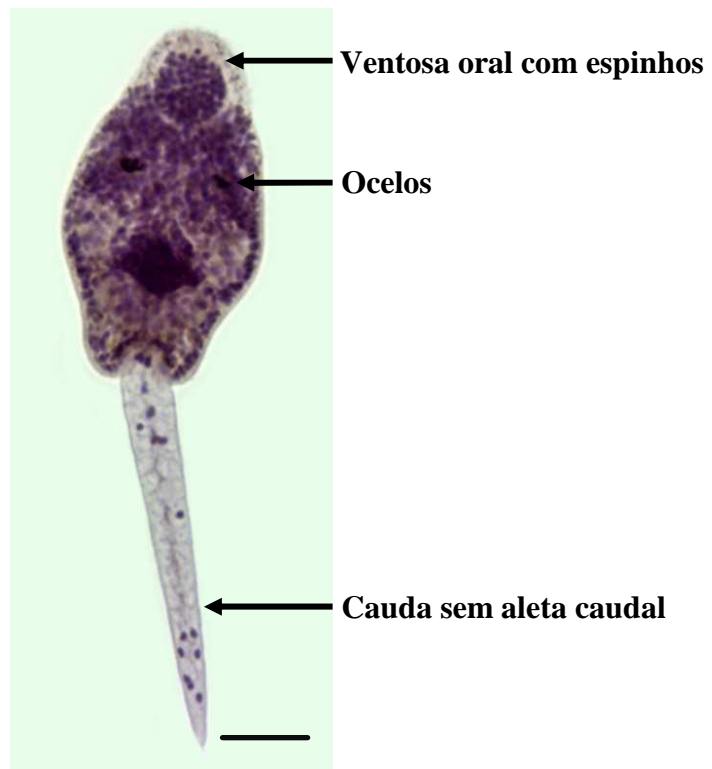
Figura 25- Porcentagem de ovos e juvenis de diferentes tamanhos de *Melanoides tuberculata* (Müller, 1774), em cada classe de tamanho de concha (da Classe I a Classe IV), coletados em um riacho impactado da Vila do Abraão, Ilha Grande, Angra dos Reis, Rio de Janeiro.



3.5 Número de ovos e juvenis em fêmeas parasitadas e não parasitadas

Dentre as 348 fêmeas analisadas, 111 estavam parasitadas (32%) e 237 não estavam parasitadas (68%). As cercárias encontradas foram identificadas como do tipo Pleurolofocerca (Figura 26). Esse tipo de cercária apresenta ventosa oral com espinhos, ocelos, acetábulo vestigial, vesícula excretora epitelial bilobada e não possui aleta caudal.

Figura 26- Cercária do tipo Pleurolofocerca.

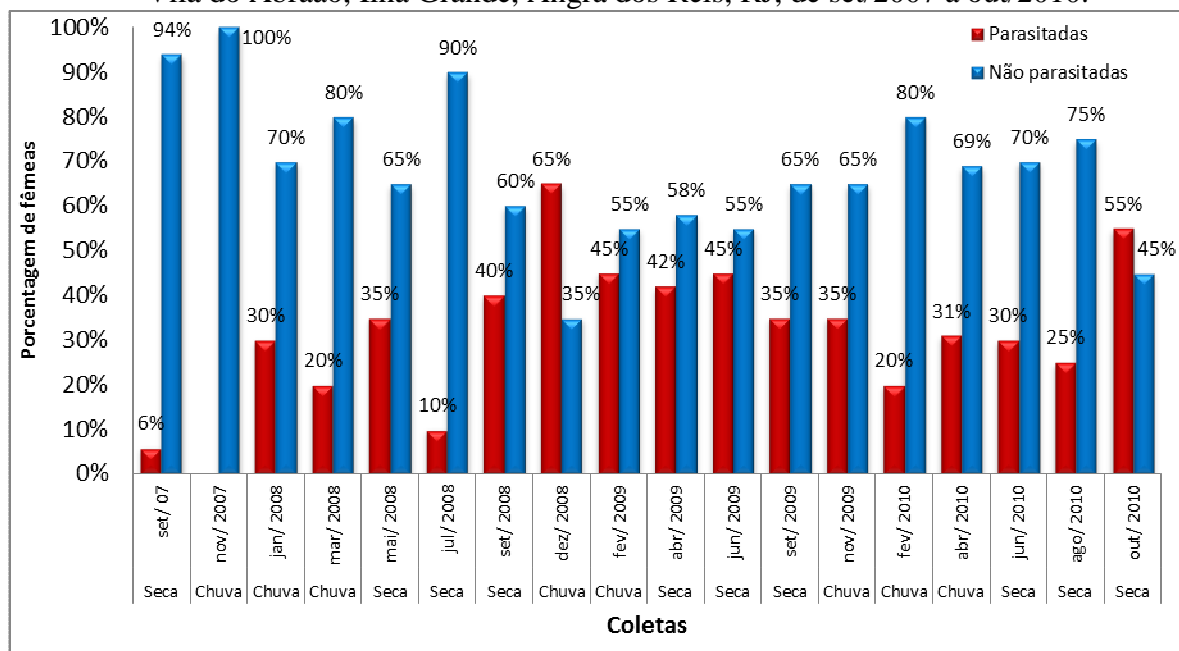


Legenda: Cercária encontrada em espécimes de *Melanoides tuberculata* (Müller, 1774) coletados da Vila do Abraão, Ilha Grande, Angra dos Reis, RJ.

Foto: H.A.Pinto, 2013.

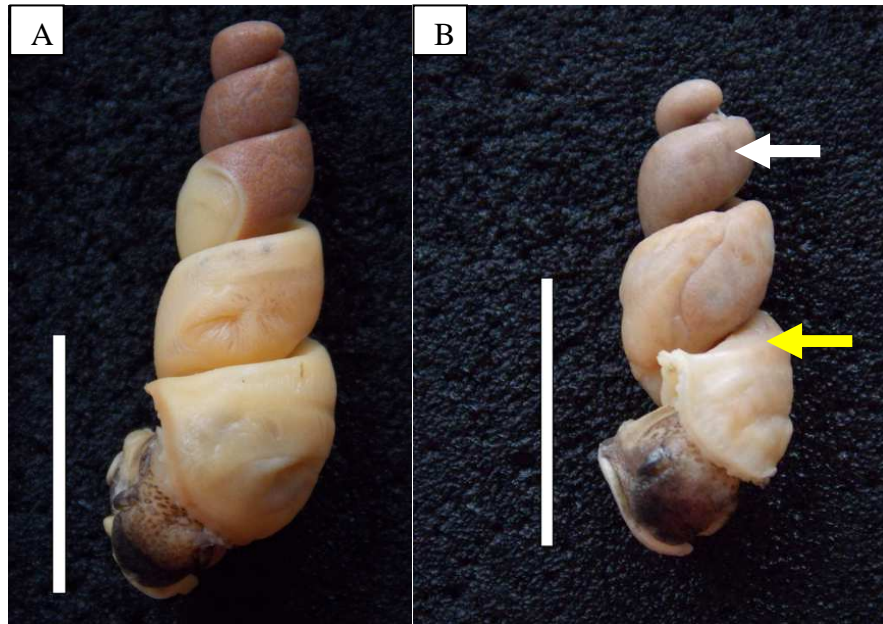
As coletas de dezembro/2008 e outubro/2010 foram as que apresentaram a maior porcentagem de fêmeas parasitadas (65% e 55% respectivamente) (Figura 27).

Figura 27- Porcentagem de fêmeas parasitadas e não parasitadas de *Melanoides tuberculata* (Müller, 1774) em cada coleta bimestral realizada em um riacho impactado da Vila do Abraão, Ilha Grande, Angra dos Reis, RJ, de set/2007 a out/2010.



Entre as 152 fêmeas que não possuíam juvenis, 93 não estavam parasitadas (61%) e 59 estavam (39%). Entre as 196 fêmeas que apresentaram juvenis, 144 não estavam parasitadas (73%) e 52 estavam parasitadas (27%). Foi possível observar também que a presença das cercárias provoca alterações físicas no animal, sendo possível verificar se os animais estão parasitados ou não, observando o exterior da parte mole (Figura 28). Os animais parasitados geralmente apresentavam a parte superior da parede da cavidade palial, próxima ao reto, espessada e de coloração marrom e a glândula digestiva esbranquiçada, ao contrário dos animais não parasitados, onde a mesma região da parede não era espessa e apresentava coloração creme e a glândula digestiva não era esbranquiçada.

Figura 28- Fêmeas de *Melanoides tuberculata* .



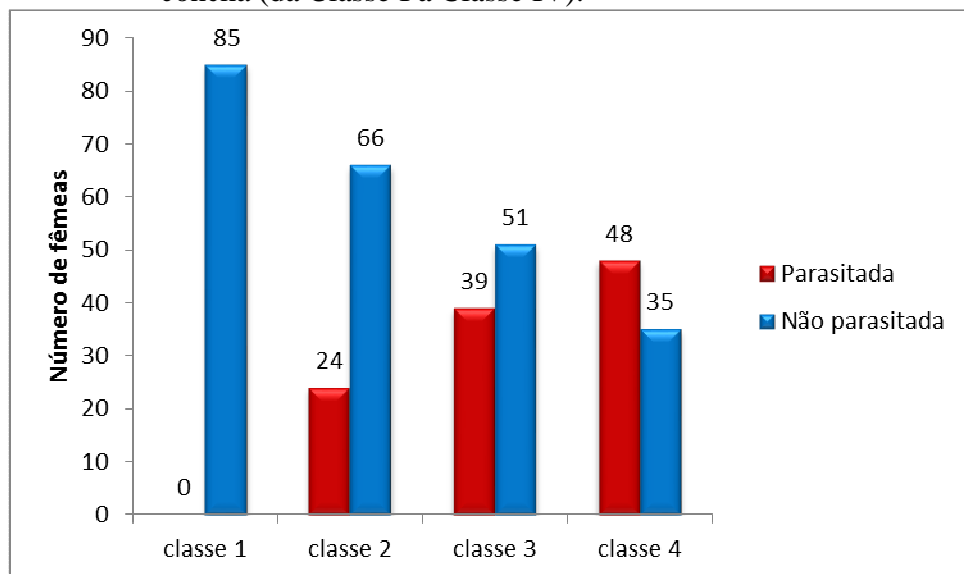
Legenda: (A) - Não parasitada, (B)- Parasitada. A seta branca está indicando a glândula digestiva esbranquiçada devido a presença de parasitos e a seta amarela a região do manto amarronzada e com espessamento, também devido a presença de parasitos.

Nota: Escala=1 cm

Foto: A autora, 2013.

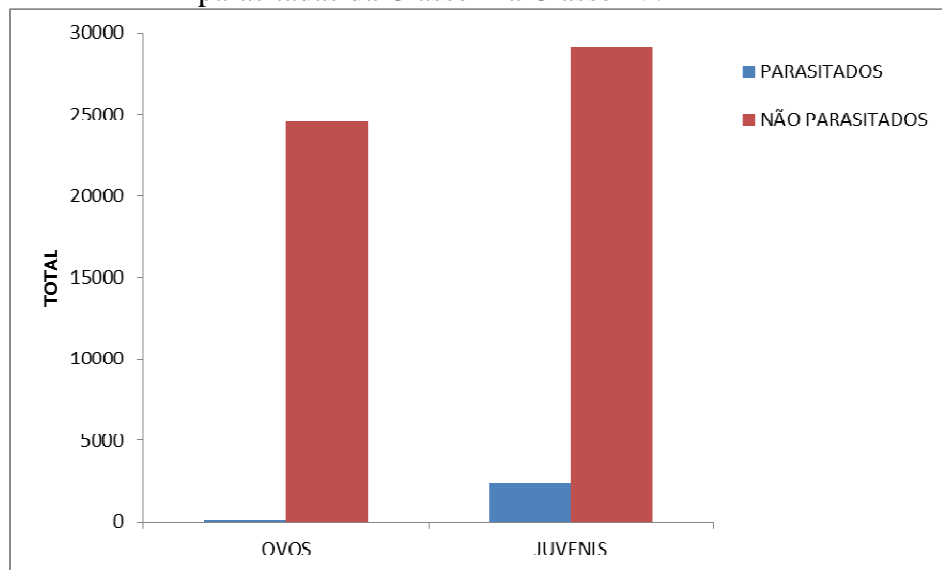
O número de fêmeas parasitadas aumentou de acordo com a classe de tamanho, ou seja, quanto maior a classe de tamanho, mais fêmeas parasitadas (Figura 29). A Classe IV apresentou mais fêmeas parasitadas do que não parasitadas (Figura 29).

Figura 29- Número de fêmeas parasitadas e não parasitadas de *Melanoides tuberculata* (Müller, 1774) em cada classe de tamanho de concha (da Classe I a Classe IV).



O Teste de Mann-Whitney, levando em consideração todas as fêmeas, demonstrou que as parasitadas apresentaram menor número de ovos e juvenis que as não parasitadas, com valor de $p < 0,01$ para ambos. Refazendo o Teste de Mann-Whitney excluindo as fêmeas da Classe I, devido ao não alcance da maturidade sexual, o resultado foi o mesmo (Figura 30), com valor de $p < 0,01$ para ambos.

Figura 30 - Total de ovos e juvenis nas fêmeas parasitadas e não parasitadas da Classe II a Classe IV.



O total de fêmeas parasitadas coletadas nos meses de seca foi 55 e nos meses de chuva foi 56. O Teste-T mostrou que não há diferença significativa no índice de parasitismo entre estação seca e chuvosa ($p > 0,01$).

3.6 Identificação específica do parasito

O parasito encontrado em *M. tuberculata* foi identificado como *C. formosanus* (Figura 31 e Figura 32). Os espécimes de *C. formosanus* encontrados em *M. tuberculata* na Vila do Abraão apresentaram a dupla coroa com 32 espinhos aciculares e vesícula excretora em formato de X, características diagnósticas da espécie.

Figura 31- Metacercária de *Centrocestus formosanus* (Nishigori,1924)



Legenda: seta preta indicando a coroa com 32 espinhos aciculares e a seta amarela indicando a vesícula excretora em formato de X. Escala: 50 μ m.

Nota: Metacercária obtida em *Poecilia reticulata* após infecção experimental por cercárias do tipo *Pleurolofocerca* emergidas de exemplares de *Melanoides tuberculata*, naturalmente infectados, coletados na Vila do Abraão, Ilha Grande.

Foto: H.A. Pinto, 2013.

Figura 32-*Centrocestus formosanus* (Nishigori, 1924).



Legenda: Seta preta indicando a coroa com 32 espinhos. Escala: 50 μ m.

Nota: Parasito adulto recuperado no intestino delgado de camundongos 30 dias após a infecção por metacercárias obtidas experimentalmente em *Poecilia reticulata* Peters, 1859 infectados por cercárias do tipo *Pleurolofocerca* emergidas de exemplares de *Melanoides tuberculata* coletados da Vila do Abraão, Ilha Grande, Angra dos Reis, RJ.

Foto: H.A. Pinto, 2013.

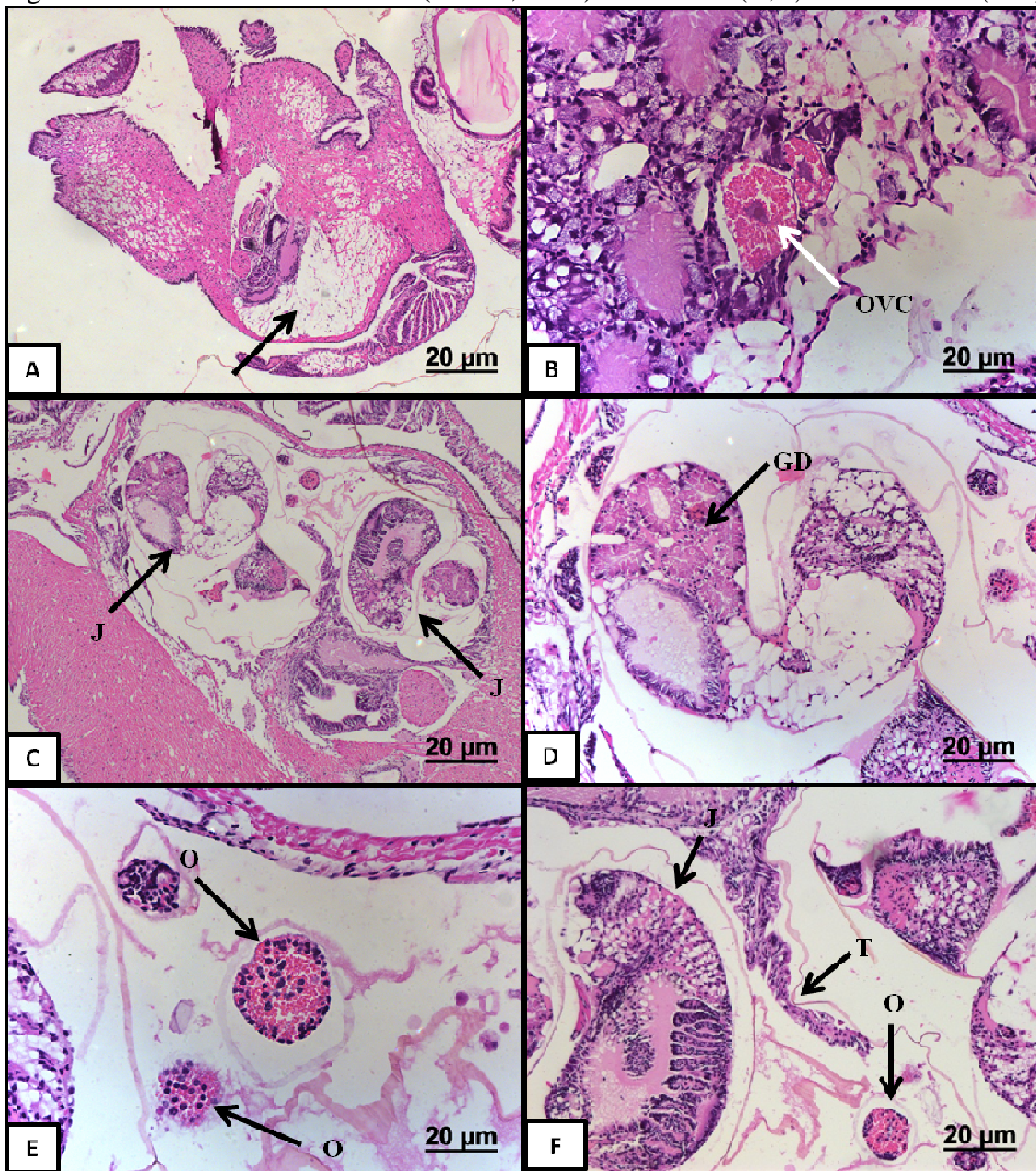
3.7 Análise histológica do ovário e do marsúpio de *Melanoides tuberculata* (Müller, 1774)

O marsúpio de *M. tuberculata* apresenta uma camada de células epiteliais e de células musculares (Figura 33C -F). Observamos que a parede do marsúpio se projeta como finas trabéculas para o lúmen, tornando-o particionado (Figura 33 C). Essas trabéculas são revestidas por uma camada de células epiteliais (Figura 33 F). Cada compartimento do marsúpio abriga ovos e juvenis de diferentes tamanhos (Figura 33 C- F). O marsúpio completamente formado estava presente em espécimes da Classe II a Classe IV. Nos espécimes da Classe I era possível observar apenas uma região onde o marsúpio se desenvolveria (Figura 33 A).

O ovário é estreito e ramificado, estando localizado ao longo da superfície columelar, parcialmente inserido na glândula digestiva (Figura 34 B). Não foi observada grande quantidade de ovócitos. Observamos a presença de ovócitos pré-vitelogênicos, ovócitos vitelogênicos iniciais e ovócitos vitelogênicos tardios (Figura 35 C). Os ovócitos pré-vitelogênicos estão localizados próximos a parede do ovário e estão completamente cercados por células foliculares. Os ovócitos vitelogênicos tardios apresentam núcleo largo, núcleo distinto e estão localizados no lúmen do ovário.

Observamos a presença de um ovário contendo ovócitos em diferentes graus de maturação na Classe I, na Classe II e na Classe III. Em apenas um espécime da Classe I foram encontrados ovócitos e este espécime apresentava 2,93 mm de diâmetro, próximo de ser classificado como da Classe II (3,00 a 5,99 mm de diâmetro).

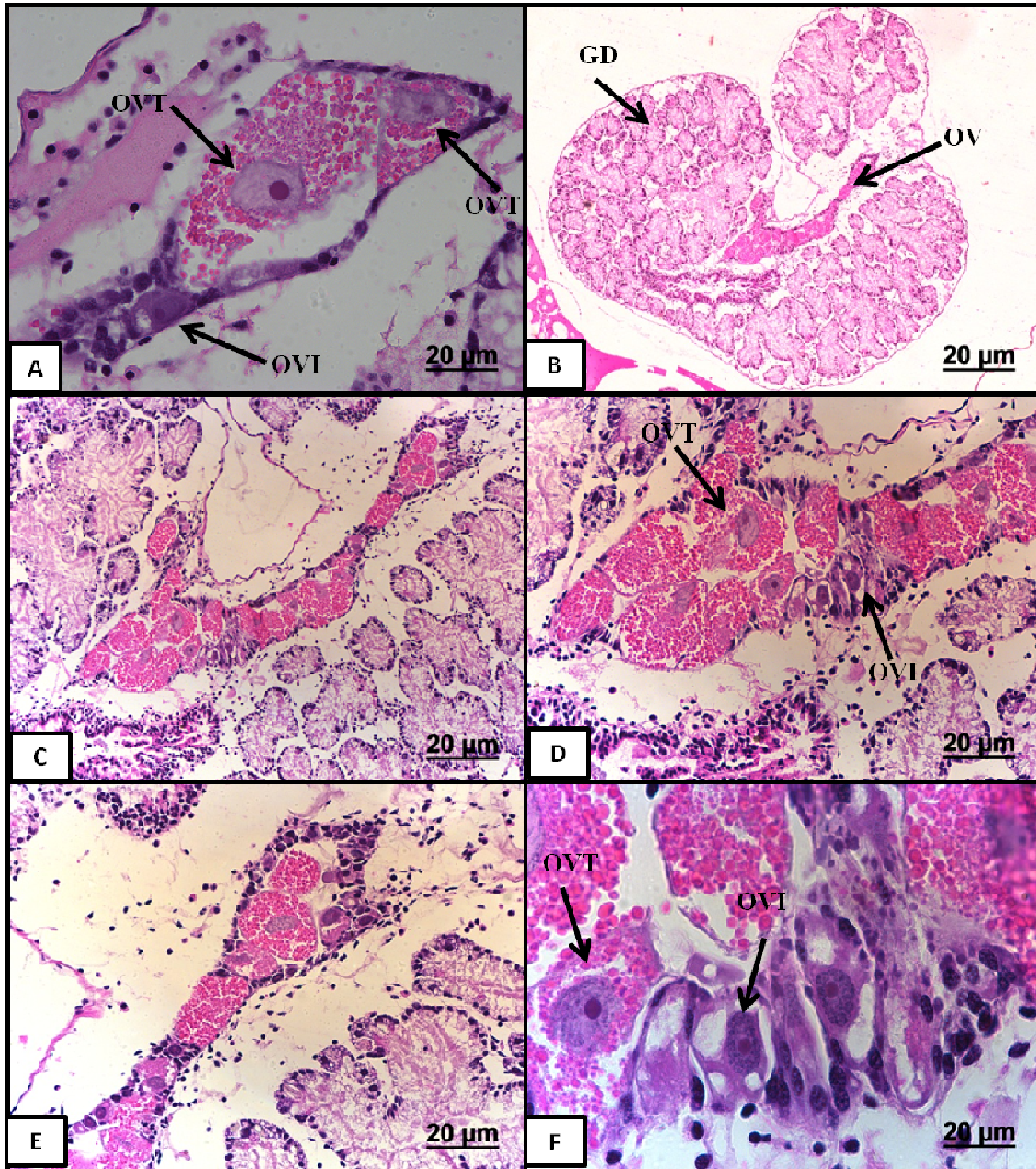
Figura 33- *Melanoides tuberculata* (Müller, 1774) da Classe I (A,B) e da Classe II (C-F).



Legenda: (A)-Região anterior exibindo espaço no qual deverá se desenvolver o marsúpio ; (B)- Secção do ovário mostrando dois ovócitos; (C) - marsúpio contendo juvenis e ovos; (D) - marsúpio com juvenil ;(E) - marsúpio com ovos; (F) - marsúpio com juvenil, ovo e trabécula.

Nota: Ovócito (OVC), juvenil (J), glândula digestiva (GD), ovo (O), trabécula (T).

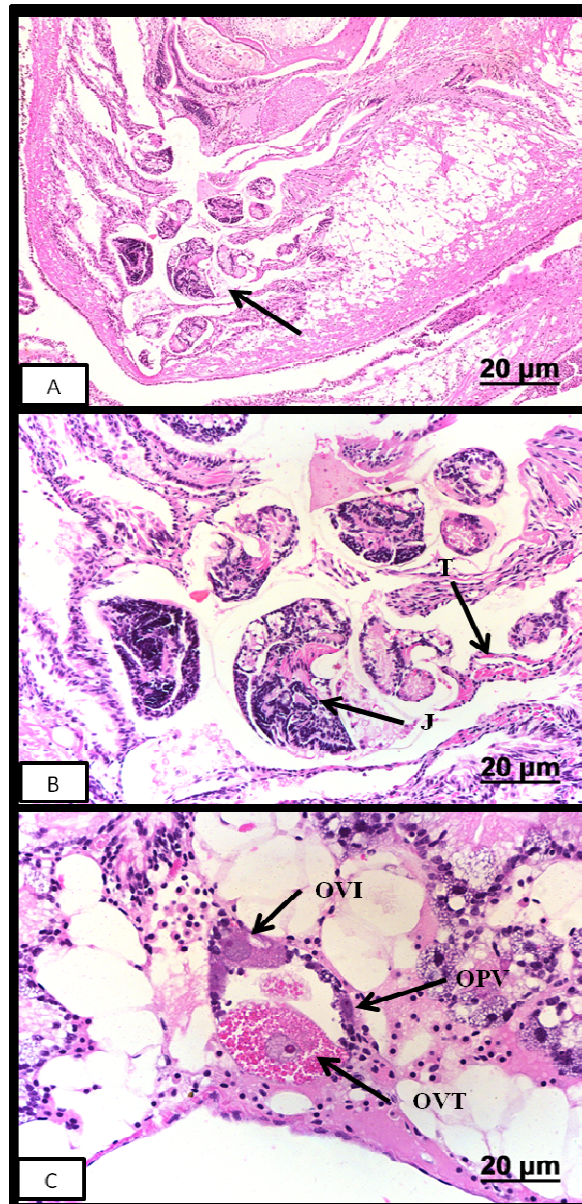
Figura 34- *Melanoides tuberculata* (Müller, 1774) da Classe II.



Legenda: (A)-Região do ovário de um espécime de *Melanoides tuberculata* (Müller, 1774) da Classe 2 mostrando dois ovócitos tardios e um pré vitelogênico; (B) - glândula digestiva e ovário; (C)- ovário; (DF) - ovário com ovócitos.

Nota: Ovócito Vitelogênico Inicial (OVI), ovócito vitelogênico tardio (OVT), glândula digestiva (GD), ovário (OV).

Figura 35- *Melanoides tuberculata* (Müller, 1774) da Classe III (C).



Legenda:(A) -Marsúpio de um espécime de *Melanoides tuberculata* (Müller, 1774) da Classe III; (B) - Detalhe do marsúpio de um espécime de *Melanoides tuberculata* (Müller, 1774) da Classe III; (C) - Secção do ovário de um espécime de *Melanoides tuberculata* (Müller, 1774) da Classe III mostrando ovócito pré-vitelogênico, vitelogênico inicial e vitelogênico tardio.

Nota: Juvenil (J), trabécula (T), ovócito vitelogênico inicial(OVI), ovócito vitelogênico tardio (OVT), ovócito pré-vitelogênico (OPV).

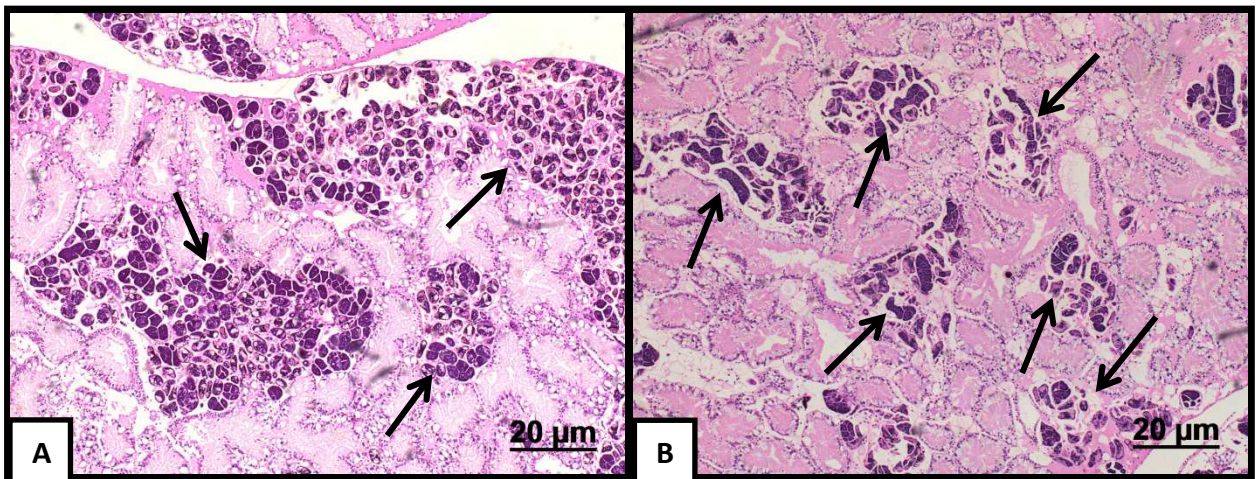
3.8 Observação da presença de parasitos através das análises histológicas de *Melanooides tuberculata* (Müller, 1774)

Das 116 fêmeas analisadas, 64 estavam parasitadas (55%) e 52 não estavam parasitadas (45%). A coleta de fevereiro/2013 foi a que apresentou maior porcentagem de fêmeas parasitadas (75%) e a coleta de outubro/2012 foi a que apresentou a menor porcentagem (44%), porém nessa coleta foram analisadas apenas 16 fêmeas, pois somente foi encontrado um espécime da Classe IV.

Levando em consideração as classes de tamanho de concha, a Classe I não apresentou nenhum espécime parasitado. A Classe II apresentou 33% dos seus espécimes parasitados, a Classe III 97% e a Classe IV 96%.

Nas lâminas dos espécimes parasitados, não foi observada a presença da gônada (Figura 36).

Figura 36- *Melanooides tuberculata* (Müller, 1774) da Classe IV.



Legenda: (A) - Glândula digestiva intensamente parasitada por *Centrocestus formosanus* (Nishigori, 1924) sem reação hemocitária; (B) - Detalhe da Glândula digestiva com ninhos parasitários contendo rédias e cercárias de *Centrocestus formosanus*.

4 DISCUSSÃO

4.1 Proporção entre machos e fêmeas

Observamos a presença de machos na população, correspondendo a aproximadamente 4,40 % da amostra, fato este não observado por Miyahira (2010) no mesmo riacho em Ilha Grande, trabalhando com exemplares coletados de julho/2006 a maio/2008. Miyahira (2010) afirmou que provavelmente a população é inteiramente partenogênética.

Jacob (1957, 1958) encontrou machos não funcionais em populações da Índia. Heller e Farstay (1989) relatam que no extremo leste da Ásia, populações de *M. tuberculata* consistem de fêmeas com poucos e raros machos estéreis. A frequência de machos nas populações é variável como apresentado por Livshits *et al* (1984). Livshits e Fishelson (1983) encontraram machos funcionais em populações isoladas em Israel. A explicação para essas observações pode ser que certas populações apresentam algumas características primitivas, como machos funcionais, sendo mais próximas das populações ancestrais (Livshits e Fishelson, 1983). Jacob (1957) em trabalho realizado com algumas espécies do gênero *Melanooides*, sendo uma delas *M. tuberculata*, encontrou duas “raças” para *M. tuberculata*, uma diplóide ($2n= 32$ cromossomos) e outra poliplóide (90 – 94 cromossomos), sendo que os machos só foram encontrados entre os poliplóides e a porcentagem foi baixa (3% da população).

Observamos que dos 16 machos encontrados, nenhum apresentou nove milímetros de diâmetro de concha ou mais. A diferenciação entre machos e fêmeas através da concha é difícil, já que fêmeas parasitadas não apresentam embriões e suas conchas são mais estreitas, assim como as conchas dos machos, afirmam Heller e Farstay (1989). As fêmeas quando não estão parasitadas tendem a ter a concha mais larga (HELLER e FARSTAY, 1989).

4.2 Variação no número de ovos e juvenis ao longo dos três anos trabalhados

Nos três anos analisados, foram encontrados ovos e juvenis em todas as coletas na Vila do Abraão. Berry e Kadri (1974) na Malásia e Dudgeon (1986) em Hong-Kong, observaram a presença de juvenis no marsúpio de *M. tuberculata* ao longo do ano. As coletas realizadas em período chuvoso foram as que apresentaram maior número de ovos e juvenis.

4.3 Variação no número de ovos e juvenis entre as classes de tamanho

Duas fêmeas da Classe I de 85 analisadas, apresentaram juvenis no marsúpio e Dudgeon (1986,1989) diz que juvenis só são encontrados no marsúpio de indivíduos com largura de concha maior que 3,5 mm de diâmetro, ou seja, juvenis seriam encontrados em animais a partir da Classe II. Uma vez que apenas dois animais da Classe I apresentaram juvenis, talvez tenha ocorrido erro na medição destes. Podendo também se tratar de indivíduos prematuros mas que não são regra, ao menos nas populações estudadas por nós e na estudada por Dudgeon (1986).

O número de ovos e juvenis aumentou, em média, de acordo com o diâmetro da concha. Berry e Kadri (1974) observaram um aumento do número de juvenis até certo ponto e em seguida o decréscimo, porém trabalharam com seis classes de tamanho de acordo com a altura da concha (10-14,9mm, 15-18,9mm, 19-22,9mm, 23- 26,9mm, 27-30,9mm, 31-34,0 mm) . Dudgeon (1986) observou que o número de juvenis em *M. tuberculata* aumentou com a largura da concha. Este mesmo autor argumenta que o aumento da massa corporal refletiria o aumento do investimento reprodutivo por classes de tamanho maior. A diminuição do número de jovens na Classe IV pode indicar a senilidade dos animais, pois os animais deste tamanho, segundo Dudgeon (1989), estariam entrando na segunda época reprodutiva, aparentemente sem o vigor da primeira. Outro fato, é que esta espécie é considerada semélpara, com poucos indivíduos iteróparos, logo, este animais maiores, em segunda época reprodutiva, seriam raros nas populações. Miyahira (2010) observou que esta classe de tamanho constitui a menor parte da população.

A elevada quantidade de ovos e juvenis encontrada em fêmeas das classes II a IV, pode refletir uma rápida taxa de reprodução, como sugeriram Berry e Kadri (1974) para *M. tuberculata* em Sg. Bunus (Malásia), que apresentaram grande quantidade de juvenis no marsúpio e que isso estava associado a altas taxas de liberação de juvenis.

4.4 Ocorrência de diferentes fases de desenvolvimento no marsúpio

Juvenis em diferentes estágios de desenvolvimento foram encontrados no marsúpio, assim como em Berry e Kadri (1974), Livshits e Fishelson (1983), Dudgeon (1986), Simone (2001) e Ben-Ami e Hodgson (2005).

O número de ovos e juvenis com menos de duas voltas foi maior que o de juvenis com duas a quatro voltas e com mais de quatro voltas. Desta forma, constatamos o predomínio de ovos e dos juvenis de menores tamanhos no marsúpio. Parece claro que nem todos chegam aos maiores tamanhos ainda no marsúpio. Pois, a variação no tamanho dos juvenis no marsúpio é constante. Assim, ou os ovos e juvenis menores servem de alimento para os maiores como sugerido por Dudgeon (1986) ou a liberação dos juvenis ocorre em diferentes tamanhos. Dudgeon (1986) observou também a predominância de juvenis dos menores tamanhos em populações na área natural de distribuição natural da espécie, indicando que talvez essa característica do ciclo reprodutivo tenha marcação genética.

Assim como foi observado por Ben-Ami e Hodgson (2005), a variabilidade de juvenis aumentou quando o número de voltas (largura) da fêmea aumentou. O aumento dessa variabilidade, segundo Ben-Ami e Hodgson (2005), sugere que os juvenis são similares em tamanho inicialmente, mas a taxa de crescimento de juvenis dentro do marsúpio varia entre indivíduos, sendo esta outra explicação possível para os juvenis de diferentes tamanhos no marsúpio de *M. tuberculata*.

4.5 Fêmeas parasitadas e não parasitadas

As fêmeas parasitadas apresentaram menor número de ovos e juvenis, mostrando o efeito esterilizante do parasita e isso pode alterar a taxa de crescimento populacional de *M. tuberculata* no riacho. May e Anderson (1983) sugerem que a taxa de crescimento populacional de uma população hospedeira pode ser alterada por uma infecção. De acordo com Ben-Ami e Heller (2005) os animais parasitados que apresentam juvenis no marsúpio, estariam em um estágio inicial da infecção e que animais sem juvenis no marsúpio, estariam em um estágio mais avançado. Foi possível observar também que a presença do parasito provoca alterações físicas no animal, tanto pela observação da parte mole quanto pela observação das lâminas histológicas. Estas alterações físicas possivelmente tem impacto

negativo na vida do molusco. Através das análises, não foi constatada a presença da gônada nos espécimes parasitados.

4.6 Identificação específica do parasito

O gênero *Centrocestus* Looss, 1899 é caracterizado principalmente pela presença de dupla coroa de espinhos aciculares e ausência de gonotil (PINTO, 2009).

O primeiro registro de *C. formosanus* para o continente americano foi feito por Martin (1958), no Havaí, EUA, através da presença de cercárias em *Melanoides newcombi* (Lea, 1856), metacercárias em peixes infectados e parasitos adultos em diferentes modelos experimentais. Já em *Melanoides tuberculata*, este parasito foi encontrado em estados norte-americanos (MITCHELL *et al.*, 2002, 2005), no México (SCHOLZ e SALGADO-MALDONADO, 2000), Venezuela (HERNANDEZ *et al.*, 2003) e na Colômbia (VELÁSQUEZ *et al.*, 2006, VERGARA e VELÁSQUEZ, 2009).

No Brasil, Simões *et al.* (2006 *apud* Pinto (2009)) encontraram metacercárias de *C. formosanus* em *Poecilia vivipara* Bloch & Schneider, 1801 oriundas da Lagoa Rodrigo de Freitas, Rio de Janeiro, RJ. O primeiro registro de *C. formosanus* em *M. tuberculata* foi feito por Pinto e Melo, 2010a, na Lagoa da Pampulha, Belo Horizonte, MG. Para a Ilha Grande, há somente este registro de *C. formosanus* em *M. tuberculata*. Segundo Webster e Davies (2001) é raro um hospedeiro ser infectado por apenas um tipo de parasito.

4.7 Análise histológica do ovário e do marsúpio de *Melanoides tuberculata* (Müller, 1774)

O ovário de *M. tuberculata* não apresentou grande número de ovócitos e os ovócitos jovens eram envoltos por células foliculares, assim como observado por Berry e Kadri (1974).

O marsúpio apresenta trabéculas, que são formadas por células musculares, revestidas por células epiteliais. Berry e Kadri (1974) e Ben-Ami e Hodgson (2005), também observaram isto, mas relataram a presença de tecido conjuntivo na composição das trabéculas, o que não foi visto neste trabalho.

No marsúpio, as células musculares estão orientadas em várias direções e são caracterizadas por um arranjo desordenado de filamentos grossos e finos, assim como foi observado por Ben-Ami e Hodgson (2005).

A presença de musculatura lisa na parede do marsúpio indica a capacidade de contração, permitindo à fêmea controlar a liberação de juvenis (Ben-Ami e Hodgson, 2005, Livshits e Fishelson, 1983). Segundo Livshits e Fishelson (1983), as fêmeas são capazes de prolongarem o tempo de incubação e controlar a liberação de juvenis.

CONCLUSÃO

A população de *M. tuberculata* no riacho onde foram coletados os espécimes analisados, não é composta somente por fêmeas e os machos ocorrem em baixa proporção.

As fêmeas de *M. tuberculata* atingem a maturidade sexual com aproximadamente 3 mm de diâmetro de concha e é possível encontrar juvenis em diferentes estágios de desenvolvimento no marsúpio.

Ovos e juvenis são formados durante o ano todo, porém com os dados obtidos não é possível afirmar que todo juvenil formado é liberado, pois de acordo com a literatura, os ovos e juvenis que não se desenvolvem podem servir de alimento para os maiores juvenis.

A interação entre *M. tuberculata* e *Centrocestus formosanus* é negativa ao molusco, devido à baixa no número de ovos e juvenis em fêmeas infectadas e às alterações físicas provocadas. Através da histologia, constatamos a ausência de parasitos na Classe I, a alta porcentagem de espécimes parasitados nas Classe III e IV e a ausência de gônada nos espécimes parasitados.

Concluimos também que quanto maior a fêmea, há mais ovos e, em média, há mais juvenis no marsúpio.

REFERÊNCIAS

- Abbot, R.T. 1973. Spread of *Melanooides tuberculata*. *Nautilus* 87 (1): 29.
- Aguiar, P.; Morera, P.; Pascual, J. 1981. First Record of *Angiostrongylus cantonensis* in Cuba. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 30 (5): 963- 965.
- Aguilar-Aguilar, R.; Martínez-Aquino, A.; Pérez-Rodríguez, R.; Pérez-Ponce-De-León, G. 2009. Digenea, Heterophyidae, *Centrocestus formosanus* (Nishigori, 1924) metacercariae: Distribution extension for Mexico, new state record, and geographic distribution map. *Check List* 5(2): 357–359.
- Ben-ami, F.; Heller, J. 2005. Spatial and temporal patterns of parthenogenesis and parasitism in the freshwater snail *Melanooides tuberculata*. *Journal of Evolutionary Biology* 18: 138–146.
- Ben-ami, F.; Hodgson, A.N. 2005. Ovoviviparity and the structure of the brood pouch in *Melanooides tuberculata*. (Gastropoda: Prosobranchia: Thiaridae). *Journal of Morphology* 263: 322–329.
- Bentham-Jutting, W.S.S. 1956. Systematic studies on the non-marine Mollusca of the Indo-Australian archipelago. V – Critical revision of the Javanese freshwater gastropods. *Treubia* 23: 259-477.
- Berry, A.J.; Kadri, A.H. 1974. Reproduction in the Malayan freshwater cerithicean gastropod *Melanooides tuberculata*. *Journal of Zoology* 172: 369 – 381.
- Boaventura, M.F.; Fernandez, M.A.; Thiengo, S.C., Silva, R.E.; De Melo, A. L. 2002. Formas larvais de Trematoda provenientes de gastrópodes límnicos da microrregião Rio de Janeiro, sudeste do Brasil. *Lundiana* 3(1): 45-49.
- Bogéa, T.; Cordeiro, F.M.; De Gouveia, J.S. *Melanooides tuberculatus* (Gastropoda: Thiaridae) as intermediate host of Heterophyidae (Trematoda: Digenea) in Rio de Janeiro Metropolitan area, Brazil. 2005. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 47 (2): 87-90.
- Brandt, R.A. 1974. The non-marine aquatic Mollusca of Thailand. *Archiv für Molluskenkunde* 105 (1- 4): 1-423.
- Carvalho, O.S. 1986. Ocorrência de um tiarídeo (Mollusca) no Lago de Pampulha Belo Horizonte, MG, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 19(1): 57.
- Lai C.H.; Yen C.M.; Chin C.; Chung H.C.; Kuo H.C.; Lin, H.H. 2007. Eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis* after ingestion of raw frogs. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 76 (2): 399–402.

- Dechruksa, W.; Krailas, D.; Ukong, S.; Inkapatanakul, W.; Koonchornboon, T. 2007. Trematode infections of the freshwater snail family Thiaridae in the Khek River, Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine e Public Health* 38 (6): 1016-1028.
- De Marco Júnior, P. 1999. Invasion by the introduced aquatic snail *Melanooides tuberculata* (Müller, 1774) (Gastropoda: Prosobranchia: Thiaridae) of the Rio Doce State Park, Minas Gerais, Brazil. *Studies on Neotropical fauna and Environment* 34: 186-189.
- Derraik, J.G.B. 2008. The potential significance to human health associated with the establishment of the snail *Melanooides tuberculata* in New Zealand. *The New Zealand Medical Journal* 121(1280): 3221.
- Díaz, M.T.; Hernandez, L.E.E.; Bashirullah, A.K. 2008. Studies on the life cycle of *Haplorchis pumilio* (Looss, 1896) (Trematoda: Heterophyidae) in Venezuela. *Revista Científica, FCV-LUZ* 18 (1): 35-42.
- Dudgeon, D. 1986. The life cycle, population dynamics and productibility of *Melanooides tuberculata* (Müller, 1774) (Gastropoda: Prosobranchia: Thiaridae) in Hong Kong. *Journal of Zoology* 208: 37-53.
- Dudgeon, D. 1989. Ecological strategies of Hong Kong Thiaridae (Gastropoda: Prosobranchia). *Malacological Review* 22: 39-53.
- Duggan, I.C. 2002. First record of a wild population of the tropical snail *Melanooides tuberculata* in New Zealand natural waters. *Journal Marine and Freshwater Research* 36: 825-829.
- Dundee, D.S.; Paine, A. 1977. Ecology of the snail, *Melanooides tuberculata* (Müller), intermediate host of the human liver fluke (*Opisthorchis sinensis*) in New Orleans, Louisiana. *Nautilus* 91(1): 17-20.
- Elkarmi, A.Z.; N.S. Ismail. 2007. Growth models and shell morphometrics of tow populations of *Melanooides tuberculata* (Thiaridae) living in hot springs and freshwater pools. *Journal of Limnology* 66 (2): 90-96.
- Facon, B, Pointier, J.P., Glaubrecht, M.; Poux, P.; Jarne, P.; David, P. 2003. A molecular phylogeography approach to biological invasions of the New World by parthenogenetic Thiarid snails. *Molecular Ecology* 12: 3027–3039.
- Fernandez, M.A.; Thiengo, S.C.; Boaventura, M.F. 2001. Gastrópodes límnicos do Campus de Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 34 (3): 279-282.
- Fernandez, M.A.; Thiengo, S.C.; Simone, L.R. 2003. Distribution of the introduced freshwater snail *Melanooides tuberculatus* (Gastropoda: Thiaridae) in Brazil. *The Nautilus* 117(3): 78-83.
- Freitas J.R.; Bedê L.C.; De Marco Júnior P.; Rocha L.A.; Santos M.B. 1987. Populations dynamics of aquatic snails in Pampulha Reservoir. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 4 (82): 299-305.

- Gibson, D. I. 1996. Trematoda. In: Margolis, L. e Kabata, Z, editores. Guide to the parasites of fishes of Canada. Part IV. Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences 124: 373 p.
- Giovanelli, A.; Silva, C.L.P.A.C.; Leal, G.B.E.; Baptista, D.F. 2005. Habitat preference of freshwater snails in relation to environmental factors and the presence of the competitor snail *Melanooides tuberculatus* (Müller, 1774). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 100: 169-176.
- Giovanelli, A.; Soares, M.S.; D'andréa, P.S.; Gonçalves, M.M.L.; Rey, L. 2001. Abundância e infecção do molusco *Biomphalaria glabrata* pelo *Schistosoma mansoni* no Estado do Rio de Janeiro. *Revista de Saúde Pública* 35 (6): 523- 30.
- Guimarães, C.T.; Souza, C.P.; Soares, D.M. 2001. Possible competitive displacement of Planorbids by *Melanooides tuberculata* in Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 96: 173-176.
- Heller, J.; Farstay, V. 1989. A field method to separate males and females of the freshwater snail *Melanooides tuberculata*. *Journal of Molluscan Studies* 55: 427-429.
- Hodgson, A.N.; Heller, J. 1990. Spermatogenesis and sperm *Melanooides tuberculata*. *Israel Journal of Zoology* 37: 31-50.
- Houbrick, R.S. 1987. Anatomy, Reproductive Biology, and Phylogeny of the Planaxidae (Cerithiacea: Prosobranchia). *Smithsonian Contributions to Zoology* 445: 1-57.
- Ibrahim, M.M. 2007. Prevalence and intensity of *Angiostrongylus cantonensis* in freshwater snails in relation to some ecological and biological factors. *Parasite* 14:61-70.
- Ismail, N.S. ; Arif, A.M.S. 1993. Population dynamics of *Melanooides tuberculata* (Thiaridae) snails in a desert spring, United State Arab Emirates and infection with larval trematodes. *Hydrobiologia* 257: 57- 64.
- Jacob, J. 1957. Cytological studies of Melaniidae (Mollusca) with special reference to parthenogenesis and polyploidy. I. Oogenesis of the parthenogenic species of *Melanooides* (Prosobranchia-Gastropoda). – *Transactions of the Royal Society of Edinburgh* 63: 341-352,
- Jacob, J. 1958. Cytological studies of Melaniidae (Mollusca) with special reference to parthenogenesis and polyploidy. II. A study of meiosis in the rare males of the polyploid race of *M. tuberculata* and *M. lineatus*. – *Transactions of the Royal Society of Edinburgh* 63: 433-444.
- Jhayya, S. T. J.; Coloma, S. M. A.; Pérez, V. M. ; Montaña, E. D. 2000. Paragonimíase pulmonar e pleural: relato de dois casos. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* (2): 103-106.
- Leite, O.H.M.; Higaki, Y.; Serpentine, S.L.P.; Carvalho, S.A.; Amato Neto, V.; Torres, D.M.A.; Dias, R.M.D.S. ; Chieffi, P.P. 1989. Infecção por *Clonorchis sinensis* em imigrantes asiáticos no Brasil. Tratamento com Praziquantel. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 31 (6): 416-422.
- Levy, K. 2004. Neglected consequences: role of introduced aquatic species in the spread of infectious diseases. *EcoHealth* 1: 296-305.

- Tratamento com Praziquantel. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 31 (6): 416-422.
- Levy, K. 2004. Neglected consequences: role of introduced aquatic species in the spread of infectious diseases. *EcoHealth* 1: 296–305.
- Livshits, G. , Fishelson, L. 1983. Biology and reproduction of the freshwater snail *Melanooides tuberculata* (Gastropoda: Prosobranchia) in Israel. *Israel Journal of Zoology* 32: 21-35.
- Livshits, G.; Fishelson, L.; WISE, G.S. 1984. Genetic similarity and diversity of parthenogenetic and bisexual populations of the freshwater snail. *Melanooides tuberculata* (Gastropoda: Prosobranchia). *Biological Journal of the Linnean Society* 23: 41-54.
- Madsen, H.; Fradsen. 1989. The spread of freshwater snails including those of medical and veterinary importance. *Acta Tropica* 46: 139-146.
- May, R.M. ; Anderson, R.M. 1983. Epidemiology and genetics in the coevolution of parasites and hosts. *Proceedings of the Royal Society of London B Biological Science* 219: 281–313.
- Microsoft® Office Excel® 2007. Versão 12.0. Microsoft Corporation 1985- 2007.
- Mitchell, A. J.; Goodwin, A.E.; Salmon, M.J.; Brandt, T.M. 2002. Experimental infection of an exotic heterophyid trematode, *Centrocestus formosanus*, in four aquaculture fishes. *North American journal of aquaculture* 64 (1): 55-59.
- Mitchell, A. J., Overstreet, R.M., Goodwin, A.E., Brandt, T.M. 2005. Spread of an exotic fish-gill trematode: a far-reaching and complex problem. *Fisheries* 30 (8): 11-16.
- Miyahira, I.C. 2010. *Dinâmica populacional de Melanooides tuberculatus (Müller, 1774) em um riacho impactado da Vila do Abraão, Ilha Grande, Angra dos Reis, RJ, Brasil* [dissertação]. [Rio de Janeiro(RJ)]: Universidade do Estado do Rio de Janeiro.
- Morrison, J.P.E. 1954. The relationships of Old and New World Melanians. *Proceedings of The United States National Museum* 103: 357- 394.
- Müller, O.F. 1774. Vermivm terrestrium et fluviatilum, seu animalium infusorium, helminthicorum et testaceorum, non marinorum, succincta historia. Vol. 2. Havniae et Lipsiae, *apud* Heineck et Faber.
- Paz, R.J; Watanabe, T.; Dijck, M.P.M.; ABílio, F.J.P. 1995. First record of *Melanooides tuberculata* (Müller, 1774) (Gastropoda: Prosobranchia: Thiaridae) in the state of Paraíba (Brazil) and its possible ecological implications. *Revista Nordestina de Biologia* 10 (2): 79-84.
- Pilsbry, H.A.; Bequaert, J. 1927. Aquatic Mollusks of Belgian Congo. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 53: 69-602.
- Pinto, H.A. *Infecção natural de Melanooides tuberculata (Mollusca: Thiaridae) por Centrocestus formosanus (Trematoda: Heterophyidae) e por Philophthalmus gralli (Trematoda: Philophthalmidae) no Brasil*. 2009. 99f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG.

- Pinto, H.A. ; Melo, A.L. 2010a. *Melanoides tuberculata* (Mollusca: Thiaridae) as an intermediate host of *Centrocestus formosanus* (Trematoda: Heterophyidae) in Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 52 (4):207-210.
- Pinto, H.D ; Melo, A.L. 2010 b. *Melanoides tuberculata* as intermediate host of *Philophthalmus gralli* in Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 52(6): 323-327.
- Pinto, R. M.; Santos, L. C.; Tortelly, L. C., Menezes; R. C., Moraes, W.; Juvenal, J. C.; Gomes, D. C. 2005. Pathology and first report of natural infections of the eye trematode *Philophthalmus lachrymosus* Braun, 1902 (Digenea, Philophthalmidae) in a non-human mammalian host. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 100: 579- 583.
- Pointier, J.P. 1993. The introduction of *Melanoides tuberculata* (Mollusca: Thiaridae) to the island of Saint Lucia (West Indies) and its role in the decline of *Biomphalaria glabrata*, the snail intermediate host of *Schistosoma mansoni*. *Acta Tropica* 54: 13-18.
- Pointier, J.P. 1999. Invading freshwater gastropods: some conflicting aspects for public health. *Malacologia* 41: 402-411.
- Pointier, J.P. 2001. Invading freshwater snails and biological control in Martinique Island, French West Indies. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 96: 67-74.
- Pointier, J.P. ; Delay, B. ; Toffart, J.L. ; Lefevre, M. ; Romero – Alvarez, R. 1992. Life History traits of three morphs of *Melanoides tuberculata* (Gastropoda, Thiaridae), an invading snail in French West Indies. *Journal of Molluscan Studies* 58 : 415-423.
- Pointier, J.P. ; Jourdane, J. 2000. Biological control of the snail intermediate host of schistosomiasis in areas of low transmission: the example of the Caribbean area. *Acta Tropica* 77: 53-60.
- Pointier, J.P.; Théron, A. ; Borel, G. 1993. Ecology of the introduction snail *Melanoides tuberculata* (Gastropoda: Thiaridae) in relation to *Biomphalaria glabrata* in the marshy forest zone of Guadeloupe, French West Indies. *Journal of Molluscan Studies* 59: 421-428.
- Procop, G.W. 2009. North American Paragonimiasis (Caused by *Paragonimus kellicotti*) in the Context of Global Paragonimiasis. *Clinical Microbiology Reviews* 22 (3): 415-446.
- Proctor, E.M. ; Gregory, M.A. 1974. An ultrastructural study of ova of *Paragonimus* species from human and cat faeces. *South African Medical Journal* 48:1947–8.
- Puth, L.M.; Post, D.M.. 2005. Studying invasion: have we missed the boat? *Ecology Letters* 8: 715-721.
- Radev, V.; Kanev, I. ; Gold, D. 2000. Life cycle and identification of an eyefluke from Israel transmitted by *Melanoides tuberculata* (Müller,1774). *The Journal of Parasitology* 86 (4): 773-776.
- Santos, S.B.; Miyahira, I.C.; Lacerda, L.E.M. 2007. First record of *Melanoides tuberculatus* (Müller, 1774) and *Biomphalaria tenagophila* (d'Orbigny, 1835) on Ilha Grande, Rio de Janeiro, Brazil. *Biota Neotropica* 7(3): 361- 364.

Schell, S. *How to Know the Trematodes*. 1970. Dubuque, Iowa: William C. Brown Company Publishers, 1970. 355 p.

Scholz, T.; Salgado-Maldonado, G. 2000. The introduction and dispersal of *Centrocestus formosanus* (Nishigori, 1924) (Digenea: Heterophyidae) in Mexico: a review. *The American Midland Naturalist* 143 (1): 185-200.

Silva, C.A. ; Simões, L.C.G. 1989. Histologia da gônada de *Thiara* (Melanoides) *tuberculata* (O. F. Muller, 1774) (Gastropoda, Prosobranchia). XI Encontro Brasileiro de Malacologia, 26 a 30 de julho de 1989, USP, São Paulo.

Simone, L.R.L. 2001. Phylogenetic analyses of Cerithioidea (Mollusca, Caenogastropoda) based on comparative morphology. *Arquivos de Zoologia* 36(2): 147-263.

Simões, S. B. E; Santos, C. P.; Barbosa, H. S. *Centrocestus formosanus* (Trematoda. Heterophyidae) em *Poecilia vivipara* (Osteichthyes) da Lagoa Rodrigo de Freitas, RJ, Brasil. In: Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária & Congresso Latino-Americano de Rickettsioses, 14, 2006, Ribeirão Preto. Resumos. Ribeirão Preto, 2006. p. 299 *apud* PINTO, H. A. 2009. *Infecção natural de Melanoides tuberculata* (Mollusca: Thiaridae) por *Centrocestus formosanus* (Trematoda: Heterophyidae) e por *Philophthalmus gralli* (Trematoda: Philophthalmidae) no Brasil [dissertação] .[Belo Horizonte (MG)]: Universidade Federal de Minas Gerais.

Slom, T. J.; Cortese, M.M.; Gerber, S.I.; Jones, R.C.; Holtz, T.H.; Lopez, A.D.; Zambrano, C.H.; Sufit, R.L.; Sakolvaree, Y.; Chaicumba, W.; Herwaldt, B.L.; Johnson, S. 2002. An outbreak of eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis* in travelers returning from The Caribbean. *The New England Journal of Medicine* 346 (9): 668 – 675.

Souto, L.S.; Brito, M.F.G. ; Rosa, L.C. 2011. *Melanoides tuberculatus* (Müller, 1774): a new threat to the conservation of native aquatic species in Sergipe, Brazil. *Scientia Plena* 7 (4).

SYSTAT 12. Versão 12.02.00. SYSTAT Software, Inc. 2007.

Thiengo, S.C.; Fernandez, M.A.; Boaventura, M.F. ; Stortti, M.A. 1998. A Survey of Freshwater Gastropods in the Microrregião Serrana of the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 93: 233-234.

Thiengo, S.C.; Fernandez, M.A.; Boaventura, M.F.; Gault, C.E, Silva; H.F.R., Mattos, A.C.; Santos, S.B. 2001. Freshwater Snails and Schistosomiasis Mansoni in the State of Rio de Janeiro, Brazil: I – Metropolitan Mesoregion. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 96: 177-184.

Thiengo, S.C.; Fernandez, M.A.; Boaventura, M.F.; Santos, S.B; Mattos, A.C. 2002 a. Freshwater Snails and Schistosomiasis Mansoni in the State of Rio de Janeiro, Brazil: II - Centro Fluminense Mesoregion. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 97 (5): 621-626.

Thiengo, S.C.; Fernandez, M.A.; Boaventura, M.F.; Magalhães, M.G.; Santos, S.B. 2002 b. Freshwater Snails and Schistosomiasis Mansoni in the State of Rio de Janeiro, Brazil: III - Baixadas Mesoregion. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 97: 43-46.

Thiengo, S.C.; Fernandez, M.A.; Mattos, A.C. Dispersão do molusco introduzido *Melanoides tuberculatus* (Müller, 1774) (Gastropoda, Thiaridae) no Brasil.. In: Tópicos em Malacologia - Ecos do XVIII EBRAM. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Malacologia, 2007, p. 101-106.

Umadevi, K. ; Madhavi, R. 2006. The life cycle of *Haplorchis pumilio* (Trematoda: Heterophyidae) from the Indian region. *Journal of Helminthology* 80: 327–332.

Vaz, J.F.; Teles, H.M.S.; Correa, M.A.; Leite, S.P.S. 1986. Ocorrência no Brasil de *Thiara (Melanoides) tuberculata* (Muller, 1774) (Gastropoda, Prosobranchia), primeiro hospedeiro intermediário de *Clonorchis sinensis* (Cobbold, 1875) (Trematoda, Platyhelminthes). *Revista de Saúde Pública* 20 (4): 318 – 22.

Vergara, D.; Velásquez, L.E. 2009. Larval stages of Digenea from *Melanoides tuberculata* (Gastropoda: Thiaridae) in Medellín, Colombia. *Acta Biológica Colombiana* 14 (1):133-140.

Viana, S.M.; Novelli, A.; Rietzler, A. C. A problemática das espécies invasoras nas bacias hidrográficas brasileiras com ênfase em *Melanoides tuberculata* (Gastropoda: Prosobranchia: Thiaridae). In: Evaldo Luís Gaeta Espíndola, Edson C. Wendland. (Org.). *Bacia Hidrográfica - Diversas Abordagens em Pesquisa*. 1 ed. São Carlos: Rima Editora, 2004, v. 3, p. 91-97.

Waikagul, J.; Dekumyoy, P.; Yoonuan, T. ;Praevanit, R. 2006. Conjunctiva philophthalmosis: a case report in Thailand. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 74: 848-849.

Webster, J.P.; Davies, C.M. 2001. Coevolution and compability in the snail-schistosome system. *Parasitology* 123, S41-S56.

World Health Organization. 1995. *Control of Foodborne Trematode Infections*. Geneva: WHO Technical Report Series 849.

Ximenes, R.F. 2011. *Tamanho, parasitismo e maturidade reprodutiva em Melanoides tuberculatus (Müller, 1774) (Gastropoda, Thiaridae) da Vila do Abraão, Ilha Grande, Angra dos Reis, RJ.* [monografia (bacharelado)]. [Rio de Janeiro (RJ)]:Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Zar, J. H. *Biostatistical analysis*. 4th edition. Prentice Hall, 1998. 939 p.