

**Perfil glicêmico de *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda: Planorbidae)
expostas a *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida:
Heterorhabditidae): Potencial controle da esquistossomose**

**Glycemic profile of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda: Planorbidae)
exposed to *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida:
Heterorhabditidae): Potential control of schistosomiasis**

DOI:10.34117/bjdv7n1-095

Recebimento dos originais: 10/12/2020

Aceitação para publicação: 07/01/2021

Ludimila Santos Amaral

Pós - doutoranda pelo programa de Ciências Veterinária pela Universidade Federal do Espírito Santo

Instituição: Universidade Federal do Espírito Santo / UFES

Endereço: Alto Universitário, s/nº - Guararema, Alegre - ES | CEP 29500-000

E-mail: mila_medvet@yahoo.com.br

Willian Teles-Leite

Graduando em Medicina Veterinária pela Universidade Estácio de Sá – UNESA –

Campus: Barra III, Vargem Pequena, RJ

Instituição: Universidade Estácio de Sá

Endereço: Estr. da Boca do Mato, 850 - Vargem Pequena, Rio de Janeiro – RJ

E-mail: jjim.teles@gmail.com

Letícia Costa-Chagas

Graduando em Medicina Veterinária pela Universidade Estácio de Sá – UNESA –

Campus: Barra III, Vargem Pequena, RJ

Instituição: Universidade Estácio de Sá

Endereço: Estr. da Boca do Mato, 850 - Vargem Pequena, Rio de Janeiro – RJ

E-mail: lele96.22k@gmail.com

Camila Sampaio-Tardin

Graduando em Medicina Veterinária pela Universidade Estácio de Sá – UNESA –

Campus: Barra III, Vargem Pequena, RJ

Instituição: Universidade Estácio de Sá

Endereço: Estr. da Boca do Mato, 850 - Vargem Pequena, Rio de Janeiro – RJ

E-mail: camilast_rock@hotmail.com

Fabício Nascimento Gaudêncio

Doutor em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Instituição: Centro Universitário de Valença / UNIFAA, RJ

Endereço: R. Srg. Vitor Hugo, 161 - Fatima, Valença - RJ, 27600-000

E-mail: fabriciogaudencio@hotmail.com

Melissa Carvalho Machado do Couto - Chambarelli

Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Instituição: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro / UFRRJ
Endereço: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Veterinária, km 7
da BR 465- Antiga Rio-São Paulo
E- mail: melcmcouto@yahoo.com.br

Victor Menezes Tunholi

Doutor em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Instituição: Instituto de Ensino Superior do Espírito Santo / MULTIVIX
Endereço: Rua Moreira, 29 – Bairro Independência Cachoeiro de Itapemirim/ES
E-mail: victortunholi@yahoo.com.br

Vinícius Menezes Tunholi-Alves

Doutor em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Instituição: Universidade Estácio de Sá – Docente e Bolsista do programa de
produtividade e pesquisa (UNESA)
Endereço: Estr. da Boca do Mato, 850 - Vargem Pequena, Rio de Janeiro – RJ
E-mail: vinicius_menezestunholi@yahoo.com.br

RESUMO

O gastrópode *Biomphalaria glabrata* presente em grande parte do território nacional, atua como principal hospedeiro intermediário do trematódeo, *Schistosoma mansoni*, causador da esquistossomose no Brasil. O nematóide entomopatogênico (NEP) *Heterorhabditis* associado com a bactéria, *Photorhabdus luminescens*, é usado mundialmente no controle biológico de diversos organismos. Porém, nada se conhece sobre a susceptibilidade de *B. glabrata* a NEPs. Nesse estudo, além de demonstrar a susceptibilidade do molusco ao nematoide, também avaliamos as alterações induzidas por *Heterorhabditis bacteriophora* em seu metabolismo glicêmico. Para tanto, seis grupos foram formados: três grupos controle, constituído por organismos não expostos ao nematoide, e três grupos infectados, que foram expostos as formas infectantes do NEP. O experimento foi realizado em duplicata, utilizando um total de 240 molucos. Significativas alterações no metabolismo de carboidratos de *B. glabrata* foram observadas após 3 semanas de infecção. Os resultados indicam diminuição dos níveis de glicose hemolinfática, bem como nos conteúdos de glicogênio estocados na glândula digestiva e glândula de albúmen do caramujo. Em paralelo, os grupos infectados também apresentaram aumento na atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH), indicando que a infecção induz a ativação de vias fermentativas do molusco. Apesar da ausência de letalidade dos grupos expostos, a infecção gerou comprometimento no metabolismo glicídico de *B. glabrata*, sobretudo, nas reservas de galactogênio, sugerindo potencial aplicabilidade em programas de controle biológico do gastrópode.

Palavras-chave: Nematóide entomopatogênico, gastrópode, infecção experimental, controle biológico.

ABSTRACT

The gastropod *Biomphalaria glabrata*, present in a large part of Brazilian territory, is the main intermediate host of *Schistosoma mansoni*, which causes schistosomiasis in Brazil. The entomopathogenic nematode (NEP) *Heterorhabditis bacteriophora* associated with the bacterium *Photorhabdus luminescens* is used worldwide for the biological control of

several organisms, but nothing is known about the susceptibility of the snail *B. glabrata* to NEPs. Due to the endemicity of the disease, alternatives for its control are important. Thus, the present study evaluated the changes induced by *Heterorhabditis bacteriophora* in *B. glabrata* after experimental infection under laboratory conditions. Six groups were formed: three control groups and three infected groups, exposed to variable nematode loads for 21 days. The experiment was carried out in duplicate, using a total of 240 snails. Significant changes in *B. glabrata* were observed in response to NEP infection, including a decrease in hemolymphatic glucose levels and reduction of the glycogen content stored in the host's digestive gland. In contrast, the infected groups showed an increase in the activity of the enzyme lactate dehydrogenase, indicating that the infection induced a breakdown in the snails' carbohydrate homeostasis. Despite the absence of lethality in the exposed groups, the infection impaired the glucose metabolism of *B. glabrata*, suggesting the potential application of *H. bacteriophora* in biological control programs of the gastropod.

Keywords: Entomopathogenic nematode, gastropod, experimental infection, biological control.

1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose é considerada uma doença endêmica e tem grande relevância no Brasil devido à alta incidência, acometendo principalmente regiões mais precárias (CARVALHO, 2003). Na América Latina é transmitida pelo trematódeo digenético *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907), assumindo o segundo lugar entre as endemias parasitárias no mundo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Vulgarmente conhecida como “barriga d’água” e/ou “doença do caramujo”, pode cursar com quadros agudos à crônicos, com potencialidade de evoluir para óbito do paciente (ROCHA, 2016). Segundo a Organização Mundial da Saúde, estima-se que no mundo todo cerca de 200 milhões de pessoas estejam infectadas, e aproximadamente 779 milhões vivam em áreas de risco de infecção (WHO, 2011).

O caráter endêmico da esquistossomose no Brasil prevalece devido à vários fatores, incluindo: clima tropical, presença de hospedeiros intermediários do parasito, além da ausência de políticas públicas relacionadas ao saneamento básico. De acordo com Costa-Neto et al. (2013), a existência de reservatórios silvestres como *Nectomys squamipes*, roedores de comportamento semi-aquático, também aumentam a dispersão de ovos em coleções hídricas, contribuindo para o cenário atual da doença no Brasil. Como alternativa na erradicação da doença, a Organização Mundial da Saúde preconiza o desenvolvimento de metodologias pautadas no controle da população de moluscos hospedeiros intermediários (WHO, 1983). Cabe lembrar que, para atingir a fase adulta, o parasito necessita obrigatoriamente passar por etapa de desenvolvimento intra-molusco,

até a formação das cercarias, que configura a unidade infectante ao hospedeiro definitivo. Assim, o controle desses organismos configura ponto chave na erradicação de algumas parasitoses.

Durante décadas, o controle de moluscos tem sido baseado na utilização de moluscicidas químicos (Machado, 1982). Contudo, seu alto custo, baixa seletividade, e os indícios do aumento de resistência (Sarquis, et al, 1998), levaram ao seu insucesso nos programas de controle de moluscos. Em decorrência dessa dificuldade, estudos foram desenvolvidos visando a utilização de agentes patogênicos como biocontroladores de diversos organismos, inclusive, caramujos (Wilson et al., 1993; Duarte et al., 2015). Recentemente, Tunholi et al (2017) demonstraram a susceptibilidade de *Lymnaea columela* a infecção por *Heterorhabditis baujardi*, LPP7. Os resultados extraídos desse estudo indicam alta taxa de mortalidade nos grupos expostos, além de significativas alterações na biologia reprodutiva, com decréscimo no número total de ovos, massas ovíferas e taxa de eclodibilidade embrionária.

Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o perfil glicídico de *B. glabrata* após infecção experimental por *Heterorhabditis bacteriophora*, determinando os conteúdos de glicose hemolinfática, reservas polissacarídicas em tecidos especializados, além de averiguar a atividade da LDH. A partir desses resultados pretende-se entender melhor a relação *B. glabrata/Heterorhabditis*, como alternativa ao controle biológico do caramujo.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO DA BIOMPHALARIA GLABRATA

Os moluscos utilizados nesse estudo foram obtidos do Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres e Reservatórios do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), localizado na cidade do Rio de Janeiro, Brasil.

2.2 OBTENÇÃO DO NEMATODA *HETERORHABDITIS BACTERIOPHORA*

Os nematodas foram doados pela equipe do Laboratório de controle Microbioano localizado na Estação para Pesquisas Parasitológicas W.O. Neitz da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, sendo mantidos e multiplicados de acordo com o método proposto por Kaya e Stock (1997) e Lindegren et al. (1993). Os nematodas coletados foram mantidos em recipientes contendo solução de água destilada e colocados em câmara climatizada a $25 \pm 1^\circ$

2.3 EXPOSIÇÃO EXPERIMENTAL AOS NEMATÓIDES, FORMAÇÃO DE GRUPOS EXPERIMENTAIS E MANUTENÇÃO DOS MOLUSCOS

Moluscos maduros sexualmente, com concha medindo 8-10 mm de diâmetro, foram separados por grupos em aquários de vidro. A infecção foi induzida a partir da exposição dos moluscos à uma solução aquosa contendo 300 juvenis infectantes/203 μL . Alíquotas de 203 μL dessa solução foram colocadas em placas de 12 furos, depois foram adicionados 1797 μL de água destilada. Posteriormente, foram escolhidos aleatoriamente moluscos para serem colocados em cada furo. Pós 24 horas de exposição, os moluscos foram retirados e transferidos para um aquário.

Os moluscos foram separados em grupos controles, com moluscos não expostos a nematodas e grupos tratados que foram expostos. Ambos grupos foram divididos em 2 subgrupos, contendo 10 moluscos cada. Todo o experimento foi conduzido em duplicata, utilizando um total de 120 moluscos. Os moluscos foram alimentados com alface (*Lactuca sativa* L.) *ad libitum* e os aquários foram limpos a cada dois dias, trocando o alimento para evitar fermentação. A mortalidade foi monitorada dia após dia até o final das 3 semanas após a infecção. O período de 3 semanas foi baseado em resultados relatados por Wilson et al. (1994) quanto a mortalidade foi observada durante a infecção de *Derocerasreticulatum* por *Heterorhabditis* sp.

2.4 DISSECÇÃO E COLETA DA HEMOLINFA

Semanalmente e ao longo das três semanas de estudo, os moluscos dos grupos controle e exposto foram dissecados e a hemolinfa foi coletada por punção cardíaca, sendo mantida a -10°C até as análises bioquímicas. Todas as amostras foram mantidas em um banho de gelo durante a dissecação.

2.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE E DA ATIVIDADE DE LDH

O espectrofotômetro Biosystems A15® foi utilizado na leitura dos testes, sendo todas as leituras feitas em duplicata. O protocolo para determinar a concentração de glicose e da atividade enzimática foi obtido a partir do documento técnico do fabricante Biosystems®, seguindo o método descrito sem alterações.

Foram utilizados 10 μl de amostra e adicionados a 1 mL de reagente colorimétrico (solução tampão de fosfato 0,05 M, pH $7,45 \pm 0,1$; aminoantipirina 0,03 mM e 15 mM de p-hidroxibenzoato de sódio; 12 kU de glicose oxidase e 0,8 kU de peroxidase por litro).

O produto formado pela oxidação da 4-aminoantipirina foi determinado por espectrofotometria com absorção máxima em 510 nm, utilizando uma solução padrão de glicose na concentração de 100 mg / dL (Mello-Silva et al., 2010). As leituras foram expressas em mg / dL.

Para a determinação da atividade de LDH, foram preparadas misturas de 1mL de solução contendo substrato (solução de lactato 0,1 M, o-fenantrolina 0,005 M em Tris 0,2 M, pH 8,8), uma gota (0,012M) de sulfato férrico de amônio e 25µl de amostra, sendo incubados a 37°C por 2 minutos. Em seguida, foram adicionadas uma gota de solução contendo 15.82 mM de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) e 3,73 mM de fenazinametassulfato, sendo incubado a 37° por 5 minutos. A reação final foi estabilizada pela adição de 1ml de ácido clorídrico 0,5M. Após a homogeneização foi feita a leitura em espetofotômetro a 505nm e os resultados expressos em UI.

2.6 DETERMINAÇÃO DO GLICOGÊNIO

O glicogênio contido na glândula digestiva e massa cefalopodal foram determinadas de acordo com o método 3,5 DMS (Sumner, 1924; Pinheiro e Gomes, 1994) e expresso em mg de glicose/ g de tecido.

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados numéricos obtidos foram expressos através de média \pm desvio-padrão e submetidos ao teste ANOVA e de Tukey-Kramer para comparação de médias.

3 RESULTADOS

A exposição à *H. bacteriophora* causou alterações no metabolismo oxidativo da *B. glabrata*. Em relação às concentrações de glicose na hemolinfa os valores médios observados nos grupos infectados foram significativamente inferiores aos grupos não expostos, com diminuições de 49,29% na primeira semana ($35,75 \pm 5,9$ mg / dl), 56,22% na segunda semana ($27,25 \pm 6,5$) e 51,70% na terceira semana ($28,5 \pm 2,65$) (Figura 1a). Uma variação oposta foi observada na atividade da lactato desidrogenase. Na primeira semana a infecção induziu um aumento significativo na atividade ($16 \pm 0,81$ UI), correspondendo a uma variação de 82% em comparação com o grupo controle ($8,75 \pm 1,6$ UI). No entanto, foi na segunda semana que ocorreu a maior diferença entre os grupos controle e infectados ($5 \pm 1,63$ IU e $15,25 \pm 3,25$ IU, respectivamente), um aumento de 205% (Figura 1b).

A exposição também resultou em variações substanciais nas concentrações de glicogênio. Em relação aos níveis de glicogênio estocados na glândula digestiva, a infecção causou diminuição da reserva, com os menores valores registrados na segunda semana de exposição ($3,8 \pm 1,03$ mg de glicose / g de tecido) (Figura 2a). Mesma tendência foi observada na glândula de albúmen (Figura 2b).

Figura 1- Relação estabelecida entre as concentrações de glicose (A) e a atividade da lactato desidrogenase (B) na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* infectada experimentalmente por *Heterorhabditis bacteriophora*. (***) indica que as médias diferem significativamente entre eles. $p < 0,0001$

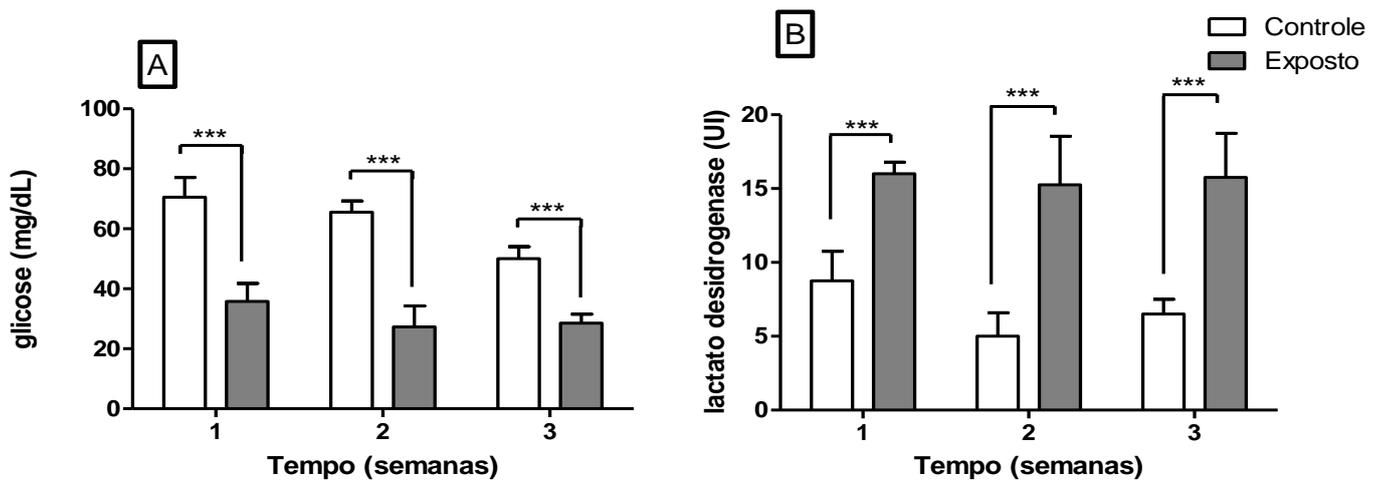
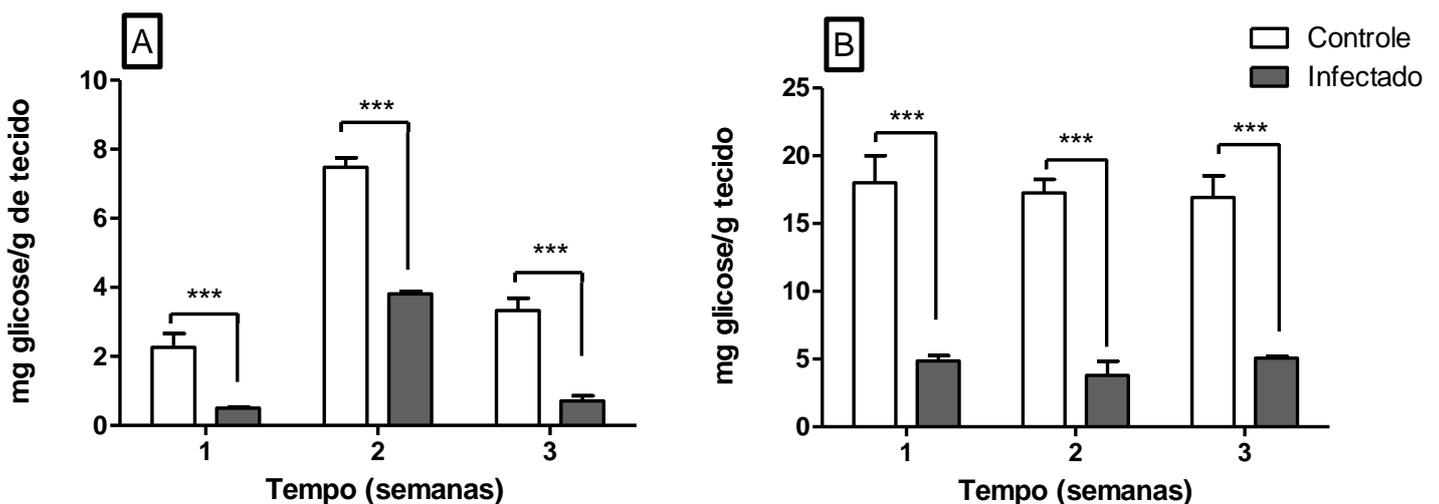


Figura 2- Relação estabelecida entre as concentrações de glicogênio da glândula digestiva (A) e na glândula de albúmen (B) de *Biomphalaria glabrata* infectada experimentalmente por *Heterorhabditis bacteriophora*. (***) indica que as médias diferem significativamente entre eles. $p < 0,0001$



4 DISCUSSÃO

Em condições fisiológicas, o metabolismo oxidativo de gastrópodes é dependente de vias aeróbias. No entanto, quando submetidos a condições de estresse, como aquelas determinada pelo parasitismo, esses organismos podem redirecionar seu fluxo metabólico, resultando na ativação outras vias bioquímicas, inclusive, vias fermentativas. Essa readaptação cursa com alterações importantes na composição da hemolinfa, resultando frequentemente na depleção de reservas energéticas e aumento nas concentrações de ácido úrico e ureia, em resposta a intensa desaminação de aminoácidos. Este fato, tem sido apresentado por Tunholi et al. (2014) ao estudar as alterações fisiológicas de *Bradybaena similares* induzidas pelo nematoide entomopatogênico *H. indica* LPP1. No presente estudo, redução significativa nos conteúdos de glicose foi observado após infecção por *H. bacteriophora* em *B. glabrata*. Tais achados resultam da competição direta de nutrientes por parte do nematoide, bem como, da habilidade da bactéria endossimbiótica, *P. luminescens*, em usar glicose como substrato energético, favorecendo o estado de hipoglicemia (Gil et al., 2002).

Em resposta a redução nos conteúdos de glicose, intensa mobilização de glicogênio na glândula digestiva é verificado, como tentativa em normalizar as concentrações desse açúcar na hemolinfa dos moluscos parasitados. Este fato elucidada o estabelecimento de mecanismos reguladores, entre tecido e hemolinfa, que são acionados, toda vez que o hospedeiro apresenta balanço energético negativo. Condições similares foram constatados por outros autores, onde correlacionam o esgotamento dessas reservas (glicogenólise), como resposta fisiológica do caramujo frente as condições adversas causadas durante infecção (Baudoin, 1975), jejum prolongado (Lira et al., 2000), e exposição a moluscidas à base de plantas (Silva et al., 2012). Porém, em nosso estudo, a mobilização de glicogênio não foi suficiente para restabelecer os níveis glicêmicos de *B. glabrata*, confirmando que a infecção por *H. bacteriophora*, induz ‘quebra’ no metabolismo de carboidratos do molusco.

Esse cenário, foi acompanhado também por profunda redução nas concentrações de galactogênio. O galactogênio é um polissacarídeo encontrado apenas nas células da glândula albúmen de gastrópodes, sendo considerado o principal constituinte do fluido perivitelínico (Faro et al., 2013). Este fluido é utilizado pelos embriões, assegurando todo aporte energético/nutricional requerido durante etapa de desenvolvimento e divisão mitótica. Portanto, em resposta ao esgotamento das reservas desse polissacarídeo, espera-se comprometimento na performance reprodutiva dos molusco, caracterizado não apenas

por uma redução no número total de ovos, mas também, por um decréscimo na eclobilidade embrionária. Condição semelhante foi relatada por Tunholi et al. (2017) estudando a interface *L. columella* / *H. baujardi* LPP7.

Outro dado interessante obtido nesse estudo foi o aumento na atividade da lactato desidrogenase nos grupos expostos. Esta ativação pode ser considerada uma resposta fisiológica do hospedeiro, em que vias fermentativas são ativadas para garantir não apenas a geração de ATP, mas também, a reoxidação do NADH. Este fato têm sido observado em outros estudos envolvendo diferentes modelos de infecção (Angelo et al., 2015).

5 CONCLUSÃO

Este trabalho é o primeiro relato a considerar a susceptibilidade de *B. glabrata* a infecção por *H. bacteriophora*. Embora os resultados não demonstrem letalidade na população de moluscos expostos, houve um comprometimento do status energético do hospedeiro, pois a exposição por *H. bacteriophora* induziu expressiva redução nos conteúdos de glicose quando comparado a moluscos não expostos. Tal condição fisiológica pode ser justificada pela competição de nutrientes estabelecida entre nematoide e molusco e pela capacidade de *P. luminescens* em utilizar glicose como substrato energético, aumentando a taxa de bioconversão necessária a nutrição do nematoide. Além disso, por conta das condições de balanço energético negativo, ocorreu um aumento na intensidade de reações fermentativas, como aquelas catalisadas pela LDH, denotando a transição do metabolismo aeróbio para anaeróbio. Portanto, faz necessário a realização de mais estudos a fim de melhor compreender cada sistema de relação (molusco/NEPs). Os resultados apresentados poderão ser utilizados para subsidiar trabalhos futuros que visam o controle da esquistossomose.

REFERÊNCIAS

- ANGELO, I.C et al. Physiological changes in *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) experimentally infected with entomopathogenic fungi. *Parasitol Res*, v.114, p.219-225, 2015.
- BAUDOIN, M. Host castration as a parasitic strategy. *Evolution*, v.29, p335-352, 1979.
- CARVALHO, M. S., ZEQUIM, M. A. Doenças infecto-contagiosas relacionadas as carências habitacionais na Cidade de Londrina – Paraná (Brasil). *Scripta Nova*, v. VII, n. 146, p. 113, 2003.
- COSTA-NETO, S. F. et al. Biochemical and histological changes in liver of *Nectomys squamipes* naturally infected by *Schistosoma mansoni*. *Rev Bras Parasitol Vet*, v. 22, p. 519-524, 2013.
- DUARTE, G. F. et al. New insights in to the amphibious life of *Biomphalaria glabrata* and susceptibility of its egg masses to fungal infection. *R. Invertebr Pathol*, v. 125, p. 31–36, 2015.
- FARO et al. Biological: biochemical and histopathological features related to parasitic castration of *Biomphalaria glabrata* infected by *Schistosoma mansoni*. *Exp. Parasitol*. v.134, p. 228–234, 2013
- GIL, G.H., CHOO, H.Y., GAUGLER, R. Enhancement of entomopathogenic nematode production in -in-vitro liquid culture of *Heterorhabditis bacteriophora* by fed-batch culture with glucose supplementation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v. 58, p. 751-755, 2002.
- LIRA, C.R.S., et al. Influência do Jejum Severo Sobre O Conteúdo de Proteínas Totais e de Amônio Na Hemolinfa de *Bradybaena similaris* (Gastropoda). *Rev. Brasil Zool.* 17, 907-913, 2000.
- MACHADO, P. A. The Brazilian program for schistosomiasis control. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, v 31, p. 76–86, 1982.
- MELLO-SILVA, C. C. et al. Carbohydrate metabolism alterations in *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni* and exposed to *Euphorbia splendens* var. hislopii látex. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 105, p. 492-495, 2010.
- MELLO-SILVA, C. C. et al. The influence of exposure to *Euphorbia splendens* var. hislopii látex on the concentrations of total proteins and nitrogen products in *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni*. *Acta Trop*, v. 2, p. 101–104, 2011.
- MINISTERIO DA SAUDE. Vigilância da esquistossomose mansoni: Diretrizes técnicas. Ed.14, pág.13-16, 2014.
- PINHEIRO, J., GOMES, E. M. A method for glycogen determination in molluscs. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 37, p. 569–576, 1994.

ROCHA, T. J. M. et al. Epidemiological aspects and distribution of infection cases by *Schistosoma mansoni* in municipalities in the Alagoas State, Brazil. *Rev. Pan-Amaz Saude*, v. 7, n. 2, p. 27-32, 2016.

SANTOS, N. C. et al. Toxicidade e avaliação de atividade molluscicidal de folhas de *Turnera ulmifolia*. *R BrasBioci*, v.8, p. 324-329, 2010.

SARQUIZ, O. et al. Effects of Bayluscide WP70 on the kinetic behavior of *Biomphalaria straminea* in laboratory conditions. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 93, p.239–241. 1998.
SUMNER, J. B. The estimation of sugar in diabetic urine using dinitrosalicylic acid. *J Biol Chemistry*, v. 62, p. 287–290, 1924.

SILVA et al. Effect of successive applications of the sublethal concentration of *Solanum paniculatum* in *Subulina octona* (Subulinidae). *J Natural Products*, v. 5, p.157-167, 2012.

TUNHOLI, V.M et al. Physiological alterations in *Bradybaena similaris* (Stylommatophora: Bradybaenidae) induced by the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis indica* (Rhabditida: Heterorhabditidae) strain LPP1. *Exp Parasitol*, v.139, p. 12-18, 2014.

TUNHOLI, V. M. et al. Molluscicidal potencial of *Heterorhabditis baujardi* (Rhabditida: Heterorhabditidae), strain LPP7, on *Lymnaea collumella* (Gastropoda: Pulmonata): An alternative for 558 biological control of fasciolosis. *Act Trop*, v. 173, p. 23-29, 2017.

WILSON, M. J., GLEN, D. M., GEORGE, S. K. The rhabditid nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita* as a potential biological control agent for slugs. *Biocontrol Science and Technology*, v. 3, p. 503-511, 1993.

WILSON, M. J. et al. Laboratory tests of the potential of entomopathogenic nematodes for the control of Field slugs (*Deroceras reticulatum*). *J Invertebr Pathol*, v. 64, p. 182–187, 1994.

WHO. World Health Organization, Report of the Scientific working Group on Plant Molluscicide & Guidelines for evaluation of plant molluscicides. Geneva: TDR/SC 4-SWE (4)/83.3, 1983.

WHO. World Health Organization. Schistosomiasis: number of people treated world wide in 2009. *Wkly Epidemiol Rec*. Feb; 86(9): p.73-80, 2011.