

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

MARTA JULIA FARO DOS SANTOS COSTA

Estudo da interação *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (Pulmonata: Planorbidae)-*Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 (Trematoda: Schistosomatidae): aspectos biológicos, bioquímicos e histológicos da reprodução do hospedeiro intermediário

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

Orientador: Prof. Dr. Arnaldo Maldonado Junior

RIO DE JANEIRO

2011

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

C837

Costa, Marta Julia Faro dos Santos.

Estudo da interação *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (Pulmonata: Planorbidae)-*Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 (Trematoda: Schistosomatidae): aspectos biológicos, bioquímicos e histológicos da reprodução do hospedeiro intermediário. / Marta Julia Faro dos Santos Costa. – Rio de Janeiro, 2011.

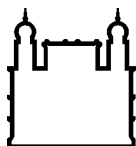
xvii, 87f. : il. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2011.

Bibliografia: f. 72-83

1. *Schistosoma mansoni*. 2. Reprodução. 3. *Biomphalaria glabrata*. 4. Castração parasitária. I. Título.

CDD 616.963



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

MARTA JULIA FARO DOS SANTOS COSTA

Estudo da interação *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (Pulmonata: Planorbidae)-
Schistosoma mansoni Sambon, 1907 (Trematoda: Schistosomatidae): aspectos biológicos,
bioquímicos e histológicos da reprodução do hospedeiro intermediário

ORIENTADOR: Prof. Dr. Arnaldo Maldonado Junior

Aprovada em: 30/05/2011

EXAMINADORES:

Profa. Dra. Delir Corrêa Gomes Maués da Serra Freire - Presidente

Prof. Dr. Otávio Samento Pieri

Prof. Dr. Paulo Marcos Zech Coelho

Profa. Dra. Silvana Carvalho Thiengo

Prof. Dr. José Roberto Machado Silva

Rio de Janeiro, 30 de maio de 2011

Esta Tese foi realizada nos seguintes laboratórios: Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios e Laboratório de Malacologia, ambos do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ/RJ; Laboratório de Patologia Experimental, LAPEX, do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, FIOCRUZ/BA, Laboratório de Patologia FIOCRUZ/RJ e no Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto de Biologia, UFRRJ e contou com o apoio financeiro da FAPERJ (APQ-1, Proc. E-26/110.807/2009).

Dedico esta Tese a meus filhos Gustavo e Isabella. Foi através deles que eu descobri o verdadeiro sentido da vida.

AGRADECIMENTOS

- Ao meu orientador Dr. Arnaldo Maldonado Júnior do Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres e Reservatórios, IOC/FIOCRUZ, pela competência na orientação desta tese. Agradeço todos os seus gestos e procedimentos que me fizeram acreditar que pessoas boas e humanas existem e que ainda confiam e acreditam em você. Desejo muito sucesso para você!
- A Dra Lygia dos Reis Corrêa e ao Dr. Lobato Paraense do Laboratório de Malacologia/IOC/FIOCRUZ que permitiram que eu realizasse parte de minha tese em seu laboratório, dividindo espaços e desfrutando de momentos muitos alegres. Com certeza esta etapa foi fundamental para toda a realização deste trabalho. Muito obrigada!
- Ao corpo técnico do Laboratório de Malacologia/IOC/FIOCRUZ, Paulo César, Heloísa, Marta e Beth pelo auxílio na manutenção e infecção dos moluscos no laboratório durante o desenvolvimento desta Tese. Foi muito bom o convívio e amizade!
- A Mariana Perazzini minha ex-estagiária tão companheira e querida pelo apoio e dedicação neste trabalho.
- As Dra. Silvana Thiengo e a Dra. Mônica Fernandez do Laboratório de Malacologia /IOC/FIOCRUZ, pelo apoio em seu laboratório.
- Ao Prof. Dr. Zilton de Andrade do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz/ FIOCRUZ/BA, agradeço pela gentileza em me receber em seu laboratório e por toda a sua colaboração na obtenção e discussão dos resultados de histologia. Esta transmissão de conhecimentos foram muito valiosas.
- A Dra. Samaly Souza, amiga querida do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz/ FIOCRUZ/BA muito, muito e muito obrigada pelas discussões tão esclarecedoras em histologia!
- A Elizângela do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz/ FIOCRUZ/BA pelo carinho e pela exaustiva colaboração na preparação do material histológico.

- Ao Prof. Dr. Jairo Pinheiro da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro/Laboratório de Fisiologia, pela orientação, paciência e disponibilidade na realização das análises bioquímicas. Realmente você foi mais que um amigo, foi um verdadeiro SANTO!
- A orientanda do professor Jairo Pinheiro, Mariana Lima pela ajuda nas análises bioquímicas.
- Ao Dr. Marcelo Pelágio e Dra. Ester Mota do Laboratório de Patologia,IOC/FIOCRUZ, pelo apoio nas análises de microscopia ótica.
- A técnica Andréa Natividade e a estagiária Thatiane Barros do laboratório de Patologia,IOC/FIOCRUZ, pela confecção das lâminas histológicas e captura das imagens.
- Ao Dr. Henrique Lenzi do laboratório de Patologia, FIOCRUZ/IOC pelo profissionalismo e sugestões em algumas etapas deste trabalho.
- Ao Dr. Paulo D'Andrea chefe do Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres e Reservatórios, FIOCRUZ/IOC, pelo apoio em me receber em seu laboratório.
- A todos os colegas do Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres e Reservatórios, FIOCRUZ/IOC, foi muito bom conhecer e conviver com vocês.
- A Dra. Clélia C.Mello Silva do Laboratório de Esquistossomose Experimental, IOC/FIOCRUZ, minha verdadeira amiga há quase 20 anos, obrigada pelo incentivo, bom humor e atenção em todos os momentos necessários.
- A Dra. Marcia Senna minha grande amiga, só tenho a agradecer pelo apoio logístico em Seropédica/RJ durante as análises bioquímicas na UFRRJ. Obrigada pelo carinho e pelos jantares maravilhosos!
- A Andréa Sobral minha amiga de longas datas, pelo incentivo constante. Torço também muito por você!

- Ao curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz.
- Ao Departamento de Ciências Biológicas da Escola Nacional de Saúde Pública, FIOCRUZ, pelo apoio durante o meu afastamento para realização deste trabalho.
- Aos amigos do Laboratório de Esquistossomose DCB/ENSP, Carlos Eduardo, Oswaldo e Marcos Quintela pelo apoio e amizade durante todos esses anos.
- Aos pesquisadores César Luiz e José Augusto do Laboratório de Avaliação e Promoção a Saúde Ambiental, IOC/FIOCRUZ pelo empréstimo do tanque para criação em massa dos moluscos.
- A Genilton Vieira e Rodrigo Méxas do Setor de Produção e Tratamento de Imagens, IOC/FIOCRUZ, pelo tratamento das imagens.
- A FAPERJ pelo apoio financeiro.

AGRADECIMENTO AOS FAMILIARES

Aos meus filhos Gustavo e Isabella. Desculpem-me pelos momentos de ausência. Eu juro que agora acabou!!!

Ao Marcos marido e companheiro dessa grande jornada, o engenheiro químico que mais entende de molusco, obrigada por todas as sugestões sempre tão bem vindas.

Aos meus pais *in memoriam* que sempre abdicaram de tantas situações para que eu fosse feliz, meu eterno muito obrigado. Onde vocês estiverem sei que estão torcendo por mim!

A Jesus Cristo, por ter sido o homem que foi, gerando tantas polêmicas e ensinamentos e que sempre esteve tão presente em minha vida. Conto contigo sempre!

E a Deus obrigada por tudo!!!

RESUMO

A castração parasitária pode ser entendida como qualquer alteração na função reprodutiva do molusco que seja decorrente da interferência das larvas dos trematódeos em desenvolvimento em seu interior, podendo levar a interrupção completa da atividade ovipositória ou apenas causar a sua redução. Neste trabalho, foi feito um estudo para observar a castração parasitária de *Biomphalaria glabrata* infectada com *Schistosoma mansoni* nos períodos pré-patente e patente. Foi estudado o efeito da infecção nos parâmetros relativos à fecundidade e fertilidade, taxa de crescimento e sobrevivência em um período de observação de 62 dias. Além disso, foram realizados estudos bioquímicos e histológicos neste mesmo período. A população de *B. glabrata* infectada com a linhagem BH do *S. mansoni* apresentou 50% de positividade e 100% de sobrevivência nos dois grupos analisados. O período pré-patente foi de 39 dias após a exposição aos miracídios. Foi observada pouca diferença no crescimento dos três grupos estudados (exposto que não eliminaram cercárias, controle e positivos que eliminaram cercárias). Moluscos expostos que não eliminaram cercárias e controle não apresentaram diferenças nos parâmetros estudados, porém os moluscos positivos (eliminando cercárias) apresentaram um decréscimo de fecundidade e fertilidade resultando em cessação da oviposição a partir de 55 dias. Quanto as alterações fisiológicas, foi observada uma oscilação dos níveis de glicose na hemolinfa com uma diminuição nos períodos onde ocorre maior mobilização energética por parte das larvas, assim como uma depleção de glicogênio na massa cefalopodal e glândula digestiva. A histopatologia mostrou que, aos 55 dias, o ovoteste apresenta uma atrofia considerável com o desaparecimento quase que total das células germinativas e o estroma de sustentação formando uma rede quase vazia. Quanto à glândula digestiva infectada aos 45 dias, evidenciou-se um foco de multiplicação parasitária com espocistos e cercárias, com o tecido da glândula bem preservada. O conteúdo dos grânulos de secreção da glândula de albúmen apresentou coloração pelo Alcian Blue (AB) pH 1,0 e 2,5 nos animais infectados, indicando a presença de carboidratos sulfatados e carboxilados. Desta forma, pode-se concluir a existência de castração parasitária em *Biomphalaria glabrata* infectada por *S.mansoni* no período patente da infecção, de forma direta e indireta. Quando a infecção foi realizada na fase adulta (maturidade sexual) observou-se a diminuição da fecundidade e fertilidade.

ABSTRACT

The parasitic castration can be understood as any change in the reproductive function of the snail which is due to interference of the larvae developing inside, leading to complete disruption of the egg laying activity or just its reduction. In this work, there was made a study to observe the parasite castration of *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni* in the pre-patent and patent phases. The effect of infection on parameters related to fecundity and fertility, growth rate and survival was studied in an observation period of 62 days. In addition, biochemical and histological features were studied in the same period. The population of *B. glabrata* infected with the BH strain of *S. mansoni* showed 50% positive and 100% survival in both groups. The prepatent period was 39 days after exposure to miracidia. We observed little difference in the growth of the three groups. Exposed snails without cercarial shedding and control group showed no differences in the parameters studied, the positive snails shedding showed a decrease in fecundity and fertility resulting in cessation of egg-laying from 55 days. The physiological changes, there was a fluctuation of glucose levels in the hemolymph with a decrease in periods where there is greater mobilization of energy by the larvae, as well as a depletion of glycogen in the cephalopodal mass and digestive gland. The histopathology showed that, at 55 days the ovotestis presented a considerable atrophy with almost complete disappearance of germ cells and supporting stroma forming a nearly empty net. The infected digestive gland at 45 days showed a focus of parasite multiplication and sporocysts with cercariae, with the gland tissue well preserved. The contents of the secretory granules of the albumen gland were stained with Alcian Blue (AB) pH 1.0 and 2.5 in infected animals, indicating the presence of sulfated and carboxylated carbohydrates. Thus, we can conclude the existence of parasitic castration in *Biomphalaria glabrata* infected *S.mansoni* the patent period of infection, directly and indirectly. When the infection was performed in adult phase (sexual maturity) a decrease in fecundity and fertility was observed.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Mapa da distribuição global da esquistossomose em 2009.....	2
Figura 1.2 - Ciclo de transmissão do <i>Schistosoma mansoni</i>	7
Figura 1.3 - Distribuição geográfica dos hospedeiros intermediários de <i>Schistosoma mansoni</i> na América do Sul	8
Figura 1.4 - <i>Biomphalaria</i> , animal retirado da concha com o manto, visualização dos órgãos internos.....	16
Figura 1.5 - <i>Biomphalaria glabrata</i> com a concha e sistema genital.....	17
Figura 1.6 – <i>Biomphalaria</i> parcialmente dissecada mostrando a interação entre os órgãos.....	18
Figura 1.7 – Planejamento experimental usado para o estudo da biologia reprodutiva de <i>Biomphalaria glabrata</i>	34
Figura 5.1 – Média do crescimento semanal da concha (mm) de <i>Biomphalaria glabrata</i> após exposição ao <i>Schistosoma mansoni</i> : expostos (moluscos que não eliminaram cercárias)■; controle (moluscos não infectados)■ e positivo (moluscos que eliminaram cercárias)■	45
Figura 5.2 -Figura 5.2 – <i>Biomphalaria glabrata</i> infectada por <i>Schistosoma mansoni</i> . Região do ovoteste com alguns esporocistos(seta) em diferentes fases de desenvolvimento com 45 dias de infecção, HE, 20X.....	49
Figura 5.3 - Figura 5.3 – <i>Biomphalaria glabrata</i> infectada com <i>Schistosoma mansoni</i> . Zona de acúmulo parasitário no interior do ovoteste a qual mostra também uma porção do órgão ainda parcialmente preservada. Notam-se espermatozoides e revestimento de células germinativas primitivas (45 dias de infecção), HE 20X	50
Figura 5.4 (a),(b) – <i>Biomphalaria glabrata</i> infectada com <i>Schistosoma mansoni</i> aos 55 dias de infecção. (a) Na região do ovoteste observa-se considerável atrofia, com desaparecimento quase total de células germinativas. Observa-se também o estroma de sustentação como uma rede quase vazia, HE 10X (b) Detalhe do ovoteste da Figura 5.4 (a), HE, 40X	51
Figura 5.5 – <i>Biomphalaria glabrata</i> sem infecção. Ovoteste normal. Observam-se espermatozoides, óvulos e revestimento de células germinativas, HE, 40X	52

Figura 5.6 – <i>Biomphalaria glabrata</i> infectada com <i>Schistosoma mansoni</i> . Foco de multiplicação parasitária entre as glândulas digestiva um pouco preservada (seta), com 45 dias de infecção, HE, 20X	53
Figura 5.7- <i>Biomphalaria glabrata</i> sem infecção. Glândula digestiva de aspecto normal, observando-se epitélio cilíndrico alto de tipo mucoso, com núcleos em posição basal, HE, 20X	54
Figura 5.8- <i>Biomphalaria glabrata</i> infectada por <i>Schistosoma mansoni</i> com sete dias de infecção. Glândula de albúmen com grânulos de secreção(seta). Alcian blue, pH 1,0, 63X	55
Figura 5.9 - <i>Biomphalaria glabrata</i> infectada por <i>Schistosoma mansoni</i> aos 35 dias de infecção. Glândula de albúmen com menor número de grânulos(seta) presentes nas células acinares. Alcian blue, pH1,0, 63X.....	56
Figura 5.10 – <i>Biomphalaria glabrata</i> infectada por <i>Schistosoma mansoni</i> com 45 dias de infecção. Glândula de albúmen com diminuição dos grânulos de secreção (seta). Alcian blue, pH1,0, 40X	57
Figura 5.11– <i>Biomphalaria glabrata</i> infectada por <i>Schistosoma mansoni</i> com 55 dias de infecção.Glândula de albúmen com intensa diminuição dos grânulos de secreção(seta). Alcian blue, pH2,5, 63X	58
Figura 5.12 – <i>Biomphalaria glabrata</i> sem infecção. Glândula de albúmen de <i>Biomphalaria glabrata</i> normal, HE, 63X	59
Figura 5.13- <i>Biomphalaria glabrata</i> infectada por <i>Schistosoma mansoni</i> com 14 dias de infecção.Glândula de albúmen grânulos de secreção preservados(seta). Tricromo Masson, 63X	60
Figura 5.14 – <i>Biomphalaria glabrata</i> infectada por <i>Schistosoma mansoni</i> com 35 dias de infecção. Detalhe da secreção ductal (seta) com 35 dias de infecção, PAS, 63X	61
Figura 5.15- <i>Biomphalaria glabrata</i> infectada pelo <i>Schistosoma mansoni</i> aos 45 de infecção. Presença de esporocisto no interior da glândula de albúmen (seta) , PAS, 63X.....	63
Figura 5.16- <i>Biomphalaria glabrata</i> infectada pelo <i>Schistosoma mansoni</i> com 50 dias de infecção. Região da glândula de albúmen com vários esporocistos presentes e uma redução do número de ácinos, onde se observa reação hemocitária, HE,40X.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1-Fecundidade e Fertilidade (média e desvio padrão) de <i>Biomphalaria glabrata</i> exposta (E) e não exposto (controle C) ao <i>Schistosoma.mansoni</i> no período pre-patente aos 39 dias de infecção.....	40
Tabela 5.2-Fecundidade e Fertilidade (média e desvio padrão) de <i>Biomphalaria glabrata</i> exposta (E) e não exposto (controle C) ao <i>Schistosoma mansoni</i> no período patente até os 62 dias de infecção.....	41
Tabela 5.3 – Infecção de <i>Biomphalaria glabrata</i> por <i>S.mansoni</i> (positivo) no período patente da infecção.....	43
Tabela 5.4 - Fecundidade e Fertilidade de <i>Biomphalaria glabrata</i> infectada com <i>Schistosoma mansoni</i> (exposto positivo) no período patente da infecção.....	44
Tabela 5.5 – Média e desvio padrão da concentração de glicose (mg/dl) na hemolinfa e concentração de glicogênio (mg de glicose/g de tecido peso fresco) na glândula digestiva e na massa cefalopodal de <i>Biomphalaria glabrata</i> infectada e não infectada por <i>Schistosoma mansoni</i>	47

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1 - Instruções para o uso da glicose.....	84
---	----

SUMÁRIO

RESUMO	x
ABSTRACT	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE ANEXOS	xv
1- INTRODUÇÃO	1
1.1 – Esquistossomose	1
1.2 - Áreas Endêmicas no Brasil.....	3
1.3 - Caracterização do Parasito	4
1.3.1 - Ciclo Biológico do <i>Schistosoma mansoni</i>	4
1.4 - Principais Espécies de Moluscos Transmissoras no Brasil.....	5
1.4.1 - Susceptibilidade e Compatibilidade dos Moluscos Hospedeiros	9
1.4.2 - Principais Fatores que Atuam no Ciclo de Vida de <i>Biomphalaria</i>	10
1.4.3 - Morfologia das bionfalarias: Estrutura Externa e Interna.....	11
1.4.3.1 - Filo Mollusca.....	11
1.4.3.2 - Classe Gastropoda.....	11
1.4.3.3 Gênero <i>Biomphalaria</i>	12
1.5 - Considerações sobre a Morfologia Interna	12
1.5.1 - Sistema digestório.....	12
1.5.2 - Sistema Circulatório e respiratório	13
1.5.3 - Sistema Reprodutor	14
1.5.3.1 – Ovoteste	14
1.5.3.2 - Oogênese.....	14
1.5.3.3 - Espermatogênese.....	15
1.5.3.4 - Os Ductos e Glândulas Acessórias	19
1.5.3.5 - Ducto Espermático, Glândula Prostática, Vasos Deferentes e Complexo Peniano	20
1.6 - Biologia Reprodutiva.....	20

1.6.1 - Alterações no Conteúdo de Glicogênio da Glândula Digestiva e Massa Cefalopodal em Moluscos Infectados por Trematódeos	22
1.6.2 - Alterações no Nível de Glicose na Hemolinfa de Moluscos Infectados por Trematódeos	23
1.6.3 - Alterações no Conteúdo de Carboidratos e Histoquímica da Glândula de Albúmen por Moluscos Infectados por Trematódeos	24
1.6.4 - Desenvolvimento do <i>Schistosoma mansoni</i> na Fase Intra-Molusco e seus Aspectos Histopatológicos	25
1.6.5 - Maturidade Sexual e Crescimento	27
1.7 - Castração Parasitária	27
2 - JUSTIFICATIVA	31
3 - OBJETIVOS	32
3.1 - Objetivo Geral	32
3.2 - Objetivos Específicos.....	32
4 - MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1 - Manutenção dos Moluscos em Laboratório	32
4.2 - Planejamento Experimental para a Biologia Reprodutiva de <i>Biomphalaria glabrata</i> .	33
4.2.1 - Infecção Experimental.....	33
4.2.2 - Parâmetros Analisados	33
4.3 - Planejamento Experimental para as Análises Bioquímicas	35
4.3.1 - Coleta da Hemolinfa, Massa Cefalopodal e Glândula Digestiva.....	35
4.3.2 – Determinação do conteúdo de glicose na hemolinfa.....	35
4.3.3 – Extração de Glicogênio da Glândula Digestiva e Massa Cefalopodal.....	35
4.4 - Histologia da Glândula Digestiva e Ovoteste de <i>Biomphalaria glabrata</i> Infectada com <i>S.mansoni</i>	36
4.4.1 - Infecção dos Moluscos.....	36
4.4.2 - Procedimentos dos Moluscos	37
4.5 - Histoquímica da Glândula de Albúmen para Polissacarídeos	37
4.6 - Análise Estatística	38
5 - RESULTADOS	38
5.1 - Aspectos da Biologia Reprodutiva de <i>Biomphalaria glabrata</i>	38

5.1.1 - Sobrevivência	38
5.1.2 - Fecundidade	38
5.1.3 - Fertilidade.....	42
5.1.4 - Crescimento.....	42
5.2 - Alterações Fisiológicas em <i>Biomphalaria glabrata</i> Infectada com <i>Schistosoma mansoni</i>	46
5.2.1 - Determinação do Conteúdo de Glicose na Hemolinfa	46
5.2.2 - Extração e Dosagem de Glicogênio da Massa Cefalopodal e da Glândula Digestiva de <i>Biomphalaria glabrata</i> Infectada com <i>Schistosoma mansoni</i>	46
5.3 – Histopatologia da Glândula Digestiva e do Ovoteste de <i>Biomphalaria glabrata</i> Infectada com <i>Schistosoma mansoni</i>	46
5.4 - Histoquímica da Glândula de Albúmen de <i>Biomphalaria glabrata</i> Infectada com <i>S.mansoni</i>	48
6 - DISCUSSÃO	62
6.1 Aspectos da Biologia Reprodutiva	62
6.1.1 - Mortalidade.....	62
6.1.2 - Crescimento	62
6.1.3 - Fecundidade e Fertilidade	65
6.1.4 - Alterações nos Conteúdos de Glicose na Hemolinfa e de Glicogênio na Massa Cefalopodal e na Glândula Digestiva de <i>Biomphalaria glabrata</i> Experimentalmente Infectada com <i>Schistosoma mansoni</i>	66
6.1.5 - Histopatologia da Glândula Digestiva e Ovoteste de <i>Biomphalaria glabrata</i> Infectada com <i>Schistosoma mansoni</i>	67
6.1.6 - Histoquímica da Glândula de Albúmen de <i>Biomphalaria glabrata</i> Infectada com <i>Schistosoma.mansoni</i>	68
6.1.7 - Castração Parasitária.....	69
7 – CONCLUSÕES	70
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
9 - ANEXO	84

1- INTRODUÇÃO

1.1 – Esquistossomose

A esquistossomose permanece como uma das parasitoses de maior prevalência com cerca de 207 milhões de portadores, a despeito de mais de um século de esforços para combatê-la (King, 2009). Existe uma consciência crescente de que o impacto da esquistossomose tem sido subestimado e que o impacto real da doença é muito mais próximo da malária e tuberculose (Bergquist, 2002). Estima-se que 779 milhões de pessoas estejam sob risco da esquistossomose em 76 países e territórios endêmicos (Figura 1.1). Do total de países em transmissão ativa, 46 estão na África albergando 97% do total dos portadores da infecção e 86% da população global sob risco (Steinmann et al, 2006).

No Brasil o Ministério da Saúde estima em 2,5 milhões de portadores, sendo que o percentual de positividade entre os portadores da infecção identificados por meio de inquéritos coproscópicos vem caindo gradativamente desde 1995, tendo alcançado 6,1% em 2005. As taxas de internação hospitalar e óbitos por esquistossomose também tem apresentado diminuição expressiva (Barbosa et al, 2008)

Das seis espécies de *Schistosoma* que parasitam o homem, somente o *Schistosoma mansoni* (Say 1907) ocorre nas Américas. As demais espécies não são encontradas no Brasil devido à inexistência de moluscos hospedeiros intermediários suscetíveis.

A esquistossomose teve sua origem na África Central disseminando-se para o norte do continente seguindo correntes migratórias humanas ao longo do Vale do rio Nilo. A transferência da esquistossomose para o Brasil foi resultado da necessidade da força de trabalho escravo para o processo produtivo, de início ligado à agricultura e, posteriormente, a mineração. A presença do molusco compatível à transmissão, a falta de condições mínimas de higiene, os hábitos de defecação próximos a rios e riachos, criaram as condições necessárias para que os parasitos trazidos pelos africanos escravizados pudessem se reproduzir (Loureiro, 1989).

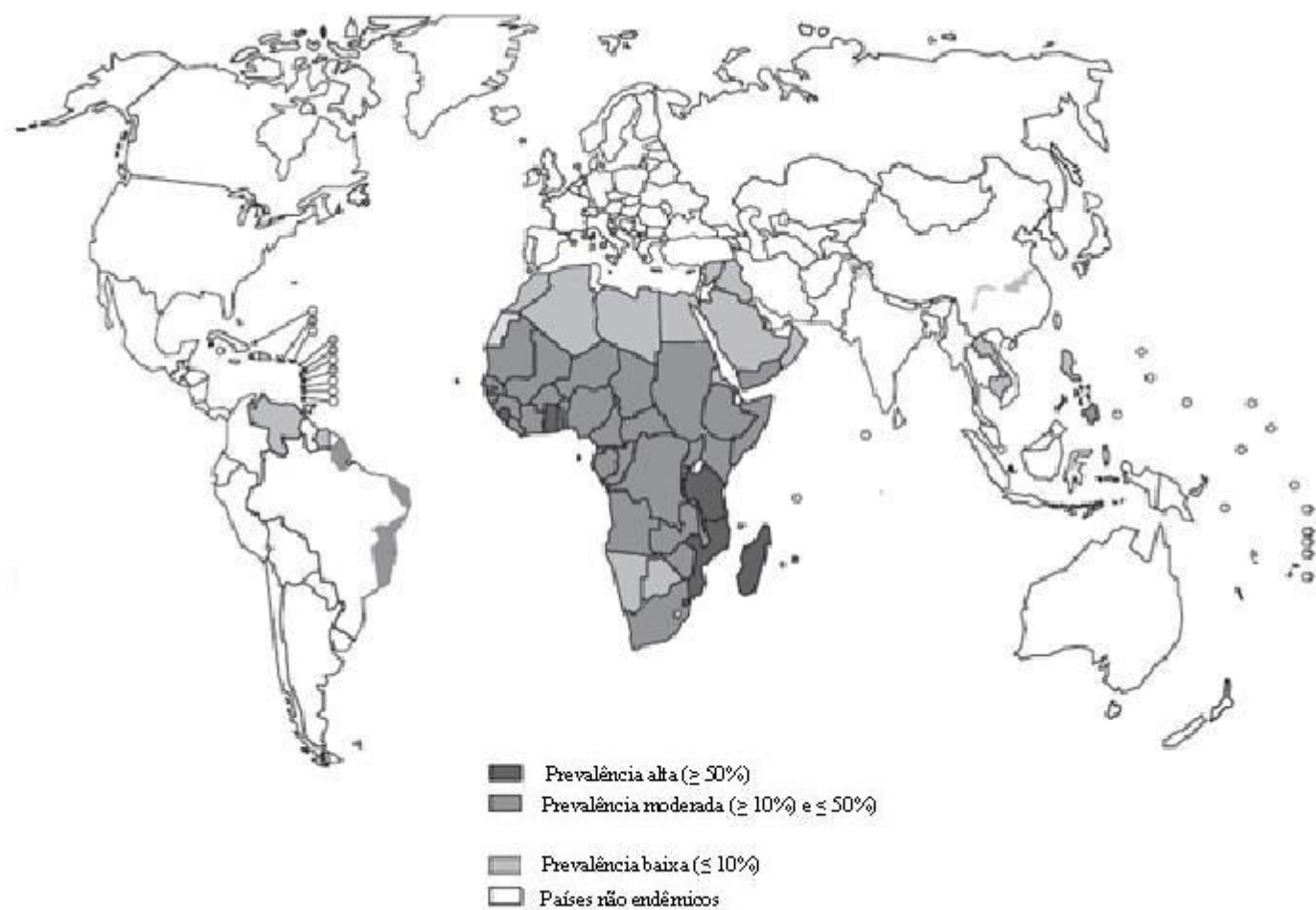


Figura 1.1 Mapa da distribuição global da esquistossomose em 2009. Fonte: WHO, 2011.

Apesar dos programas de controle, levados a efeito pelo Ministério da Saúde, a esquistossomose ainda é um grave problema de saúde pública em nosso país. Esses programas são baseados no tratamento quimioterápico das populações ou grupos de risco conjugados com medidas de saneamento, provisão de água encanada, medidas de controle ambiental (proteção de reservatórios e remanejamento de habitat dos vetores) e a educação comunitária. Entretanto, nenhuma dessas medidas pode ser realmente eficiente quando aplicada isoladamente (Katz; Coelho, 2008). É considerada uma das doenças endêmicas com grande importância epidemiológica, por suas implicações sociais, econômicas e biológicas. Com elevada taxa de prevalência em algumas regiões do Brasil, tem-se revelado de controle difícil, por ser resultado não apenas da interação entre seres humanos, moluscos e parasitas, mas também do complexo ambiente demográfico, envolvendo processos biológicos tecnológicos, políticos socioeconômico e culturais (Bruun; Aagaard-Hansen, 2008).

1.2 - Áreas Endêmicas no Brasil

As áreas endêmicas da esquistossomose no Brasil se estendem por uma faixa contínua ao longo do litoral que abrange os estados do Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia, alcançando o interior de Minas Gerais e Espírito Santo. A transmissão da doença ocorre de forma localizada nos estados do Pará, Maranhão, Piauí, Ceará, Goiás, Distrito Federal, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Ministério da Saúde, 2005).

A presença de pacientes portadores da parasitose é observada em quase todos os estados brasileiros, independentemente da existência de transmissão e esta relacionada à migração das populações, sobretudo, de zonas endêmicas. A expansão geográfica da esquistossomose se deve principalmente às migrações internas dos portadores da infecção que contribuem para a instalação de novos focos da parasitose, nas áreas de ocorrência de hospedeiros intermediários (Vidigal, 2000).

1.3 - Caracterização do Parasito

O gênero *Schistosoma* pertence ao Filo Platyhelminthes, classe Trematoda, Família Schistosomatidae. São endoparasitos obrigatórios, característica que classifica a Família que tem o sangue como biótopo e apresentam um ciclo biológico complexo, com morfologia e hospedeiros diferentes ao longo do ciclo.

Constituem um grupo zoológico de espécies inteiramente adaptadas ao parasitismo, muitas das quais tem o homem como hospedeiro habitual ou causal. Os trematódeos do gênero *Schistosoma* distinguem-se dos outros Digenea por apresentar os sexos separados, acentuado dimorfismo sexual e ao aspecto geral do corpo, alongado e com achatamento menos pronunciado (Rey, 2008).

Os vermes adultos vivem no interior dos vasos sanguíneos de mamíferos. As três espécies mais importantes para patologia humana são *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907), *Schistosoma haematobium* (Bilharz, 1852) e *Schistosoma japonicum* (Katsurada, 1904).

Schistosoma mansoni ocorre na África, na América do Sul e nas Antilhas, onde determina uma infecção que pela localização dos parasitos nas vênulas da parede do intestino grosso, sigmóide e reto, tem sintomatologia predominantemente intestinal. Sua distribuição geográfica esta condicionada pela presença de algumas espécies de moluscos de água doce, do gênero *Biomphalaria*, que são os hospedeiros intermediários do *S.mansoni*. E a doença é conhecida como esquistossomose mansônica.

Schistosoma haematobium localiza-se de preferência no plexo vesical produzindo sintomas urinários, que é conhecida como esquistossomose hematóbica (vesical). Sua distribuição é predominantemente africana, estendendo-se a outras áreas da Bacia do Mediterrâneo e Oriente Médio. Os moluscos hospedeiros são as espécies do gênero *Bulinus*.

Schistosoma japonicum é responsável por outra forma intestinal da doença no Extremo Oriente e Pacífico Ocidental que têm como hospedeiro intermediários moluscos do gênero *Oncomelania*. É conhecida como esquistossomose japônica (Rey, 2008).

1.3.1 - Ciclo Biológico do *Schistosoma mansoni*

O ciclo biológico do *S. mansoni* é complexo, pois há duas fases parasitárias: uma no hospedeiro definitivo vertebrado e outra no hospedeiro intermediário (invertebrado). Alternando com essas duas fases nos hospedeiros, há passagens de larvas de vida livre no meio aquático. O ciclo do parasito é heteroxênico.

Os vermes adultos no hospedeiro definitivo, geralmente, estão acasalados nos vasos sanguíneos, onde o macho aloja uma fêmea no canal ginecóforo. As fêmeas eliminam ovos imaturos nas vênulas da parede intestinal. Uma parte desses ovos distribui-se pela circulação atingindo vários órgãos principalmente o fígado, enquanto outra migra para a luz intestinal. Uma vez maduros (contendo o miracídio completamente formado) os ovos que permanecerem vivos irão alcançar a luz intestinal e serão eliminados nas fezes. A transmissão ocorre em função do ato de defecar próximo às margens de rios, córregos, lagoas e açudes, prática comum nas populações rurais ou por despejo direto nas coleções dulcícolas. Os ovos ao chegarem na água com as fezes eclodem e cada um libera uma larva ciliada denominada de miracídio que nada ativamente penetrando no hospedeiro intermediário moluscos do gênero *Biomphalaria*. Ao penetrar nas partes moles do molusco as larvas se transformam em esporocistos primário que, pela mutiplicação de células germinativas, produzirão esporocistos secundários. Esses esporocistos rompem-se e se dirigem para o hepatopâncreas e gônadas do molusco. Nestes locais, cada esporocisto secundário produzirá grande número de cercária que é o último estágio larvar no molusco. Decorridos 28 a 40 dias após a cercárias migrar pelo manto e pseudobrânquias do molusco, atingem o meio aquático onde nadam ativamente e ao penetrar no hospedeiro definitivo (vertebrado), perdem a cauda e são chamadas de esquistossômulos. Esses, ao caírem na corrente sanguínea, são arrastados passivamente para o coração, pulmões e fígado. No sistema porta intra-hepático, os esquistossômulos crescem e amadurecem, se transformando em vermes adultos (Rey, 2008)(Figura 1.2).

1.4 - Principais Espécies de Moluscos Transmissoras no Brasil

Dentre os moluscos da Classe Gastropoda, Subclasse Pulmonata, Ordem Basommatophora, a Família Planorbidae destaca-se por compreender moluscos transmissores da esquistossomose mansoni. A subfamília Planorbinae, caracteriza-se por ter concha enrolada em espiral plana e por sua ampla distribuição geográfica,

inclui o gênero *Biomphalaria*, o único que transmite o *Schistosoma mansoni* (Souza; Lima, 1997). No Brasil, existem dez espécies e uma subespécie do gênero *Biomphalaria*: *B. glabrata* (Say, 1818), *B. tenagophila* (Orbigny, 1848), *B. straminea* (Dunker, 1848), *B. peregrina* (Orbigny, 1835), *B. schrammi* (Crosse, 1864), *B. kuhiana* (Clessin, 1883), *B. intermedia* (Paraense; Deslandes, 1962), *B. amazonica* Paraense, 1966, *B. oligoza* Paraense, 1975, *B. occidentalis* Paraense, 1981 e *B. tenagophila guaibensis* Paraense, 1984 (Vidigal, 2000). Até o momento, no Brasil três espécies foram encontradas naturalmente infectadas por *S. mansoni* e reconhecidas como de importância epidemiológica: *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), *B. straminea* (Dunker, 1848) e *B. tenagophila* (Orbigny, 1835). (Figura 1.3).

Entre as três espécies hospedeiras no Brasil, *B. glabrata* representa o vetor mais eficaz, sendo encontrada ao longo da faixa costeira do Nordeste, algumas regiões do Norte, Sudeste, Centro-Oeste e Sul do Brasil (Paraense 1986). Devido a sua alta suscetibilidade à infecção pelo parasito, é responsável pela manutenção de vários focos ativos da doença, e o que faz com que esta seja a espécie de escolha para trabalhos experimentais, visando esclarecer mecanismos que regem a interação entre o parasito e seu principal hospedeiro intermediário (Souza, 2006). Em laboratório, essa espécie pode ser facilmente infectada. Em condições naturais já foram detectadas taxas de infecção da ordem de 70% (Rey; Pessoa, 1953; Favre et al, 2002). Paraense e Corrêa (1963) analisando populações de *B. glabrata* de diferentes localidades relataram que as diferentes linhagens desta espécie apresentavam susceptibilidade variável de 0 a 100% frente a uma única espécie do *S. mansoni* de Belo Horizonte, Minas Gerais. Desta forma, o demonstra a sua importância como vetor na transmissão da endemia.

B. tenagophila distribui-se continuamente nos estados do Rio de Janeiro, Santa Catarina, São Paulo, Bahia, Rio Grande do Sul, Distrito Federal e Espírito Santo (Souza; Lima 1997). Apesar de ser encontrada com taxas de infecção natural geralmente muito baixas, responde pelos focos do Vale do Paraíba, litoral de São Paulo e Rio de Janeiro (Rey, 2008). Paraense e Corrêa (1963), testaram a susceptibilidade de *B. tenagophila* de 18 localidades do Brasil à infecção por uma determinada linhagem de *S. mansoni*, e encontram taxas de infectividade que variaram de 0 a 91,5%.

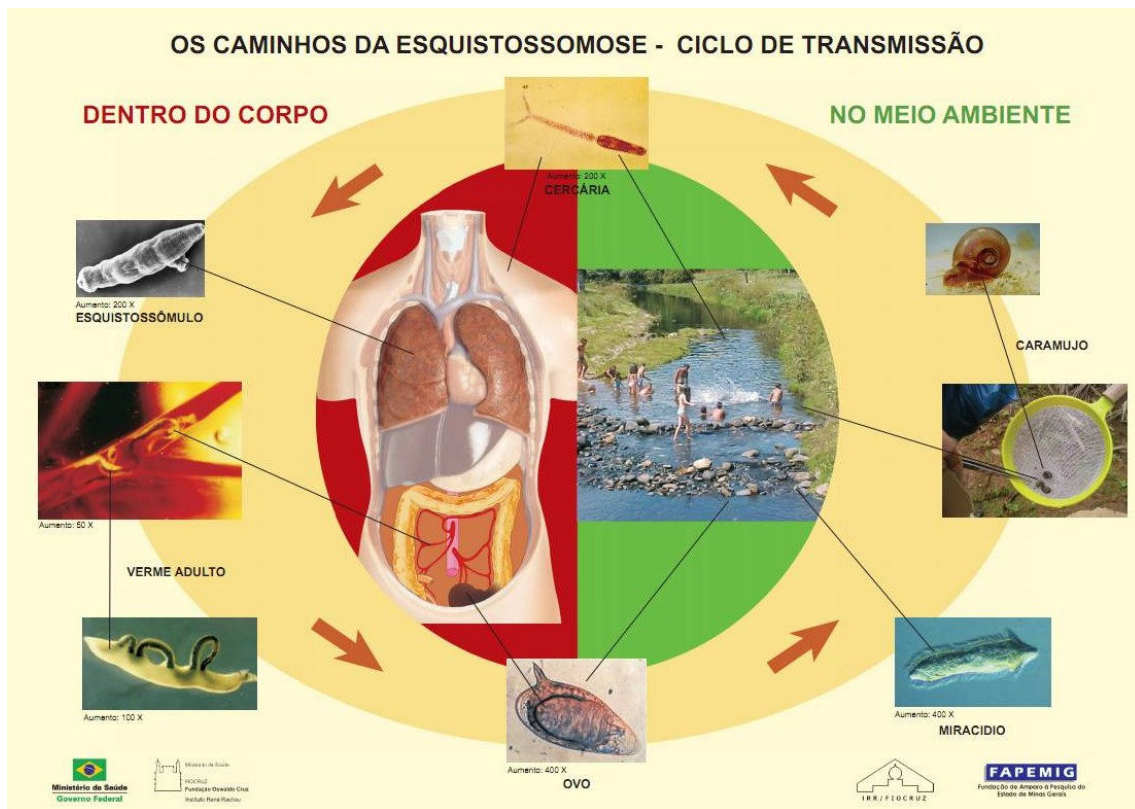


Figura 1.2. Ciclo de transmissão do *Schistosoma mansoni*. Fonte: Schall et al, 2007

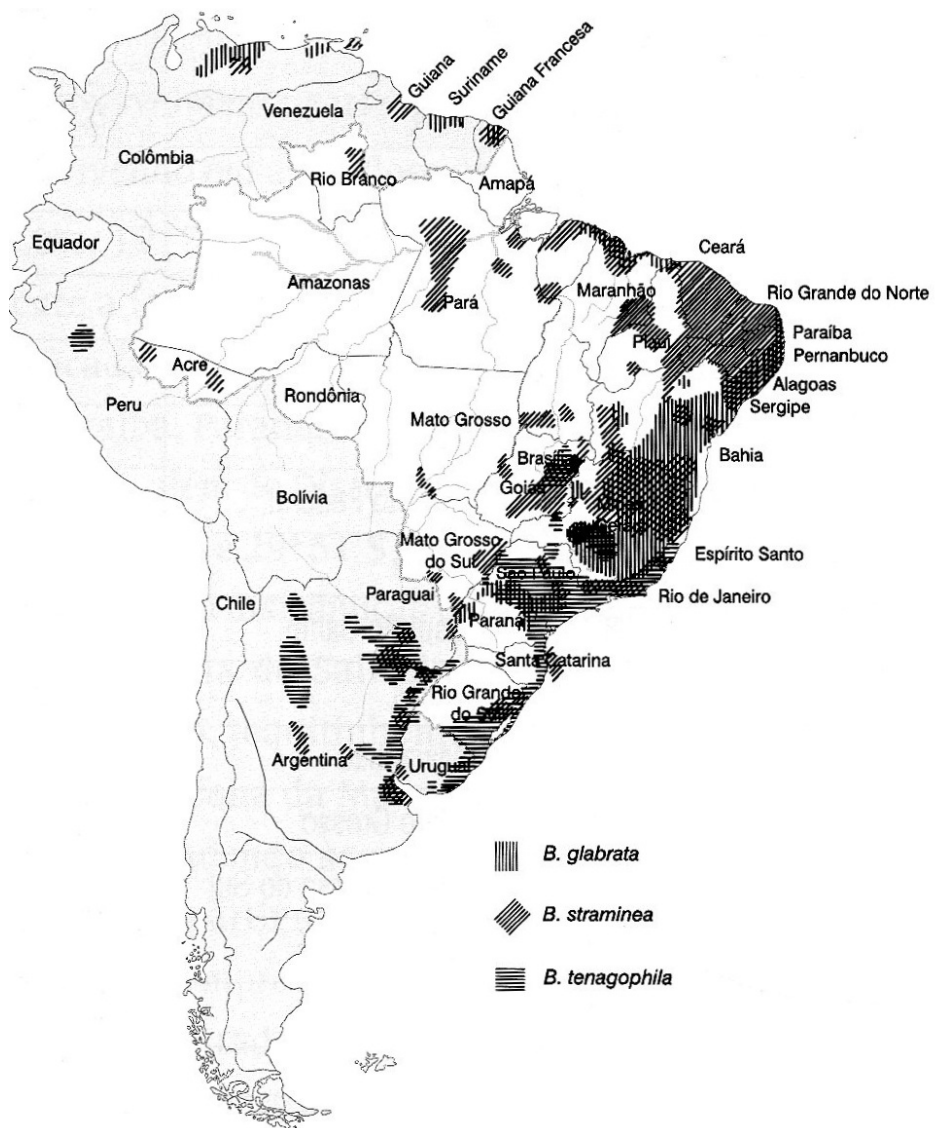


Figura 1.3 - Distribuição geográfica dos hospedeiros intermediários de *Schistosoma mansoni* na América do Sul. Fonte: Carvalho et al, 2008.

Quanto a *B. straminea*, do ponto de vista biológico, é considerada como vetor menos eficiente do *S. mansoni*, mas sua importância como transmissora na cadeia epidemiológica é significativa devido a sua ampla distribuição geográfica e sua adaptação a todas as variedades de clima e condições ecológicas do país (Paraense, 1986). É a única espécie encontrada nas condições hídricas da região do Agreste e do Sertão Nordestino. Sua ocorrência tem sido reportada em algumas regiões isoladas do Brasil e do mundo (Paraense, 1986, 1989; Teles; Vaz, 1988; Ferrari; Hofmann, 1992; Walker, 1977; Woodruff et al, 1985; Ituate, 1989; Grassi et al, 2001). Estudos de laboratório em condições semi-naturais e de campo, têm revelado a superioridade competitiva de *B.straminea* sobre *B.glabrata*. Entre os fatores envolvidos, além da baixa susceptibilidade à infecção pelo *S.mansoni* e resistência a dessecação, foram apontados a maior capacidade de dispersão e maior vagilidade da primeira espécie (Barbosa et al,1981 ,1983,1984 e 1992).

1.4.1 - Susceptibilidade e Compatibilidade dos Moluscos Hospedeiros

O grau de compatibilidade entre *Schistosoma* e os moluscos é determinado pela constituição genética tanto do parasito como do seu hospedeiro intermediário (Souza, 2006). Segundo este mesmo autor, Newton (1953) foi o primeiro a sugerir que a susceptibilidade dos moluscos *B. glabrata* a *S. mansoni* é condicionada a fatores genéticos. Posteriormente, estes resultados foram confirmados por Richards (1973), que também demonstrou que o caráter de resistência, adquirido pelo molusco na maturidade, é determinado por um único gene dominante com herança mendeliana. Souza et al (1995) avaliaram a compatibilidade de *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea* às linhagens LE, SJ e AL de *S. mansoni*. *B. tenagophila* foi pouco compatível para LE e compatível para SJ e AL. Diferentemente, *B. straminea* foi pouco compatível para SJ e fracamente compatível para LE e AL. Já *B. glabrata* foi altamente compatível para as três linhagens estudadas, confirmando a importância epidemiológica de *B. glabrata*, seguida de *B. tenagophila* e *B. straminea*. Segundo Negrão-Corrêa et al (2007) um dos fatores que influencia na susceptibilidade das bionfálias pela infecção ao *S.mansoni* é a capacidade do sistema de defesa interno do hospedeiro em reconhecer e destruir o parasita.

Souza et al (1997) comparando os níveis de susceptibilidade de *B. glabrata* originária de Belo Horizonte, *B. tenagophila* do lago da Pampulha (Belo Horizonte) e *B.straminea* da cidade de Paracatu (MG), à infecção experimental por linhagem de

S.mansoni originada do Estado de Alagoas, obteve os seguintes índices de infectividade: 75,3% , 32,6% e 11,3%, respectivamente.

A associação de *S.mansoni* com o hospedeiro intermediário tem se mostrado altamente específica e restritiva ao desenvolvimento do parasito. Algumas linhagens do parasito pode se desenvolver em uma única espécie de *Biomphalaria*, ou até mesmo a uma determinada linhagem geográfica dessa espécie de molusco, o que determina as variações na susceptibilidade dos moluscos em relação a *S.mansoni*. Sendo assim, este conjunto de fatores interfere no nível de susceptibilidade das espécies de *Biomphalaria* que transmitem a esquistossomose no Brasil (Souza, 2006).

1.4.2 - Principais Fatores que Atuam no Ciclo de Vida de *Biomphalaria*

Esses moluscos têm como habitat natural o ambiente límico que apresenta condições ecológicas para sua sobrevivência e reprodução. Habitam águas rasas, estagnadas com quantidade moderada de matéria orgânica e penetração de luz. Podem também estar presente em rios, bem como represas para produção de energia e canais de irrigação destinados à agricultura.

Os criadouros de *Biomphalaria* podem ainda estar situados em áreas de ocupação humana em cidades, vilas e assentamentos urbanos e rurais principalmente em locais onde as condições de higiene da população são precárias, onde não há rede de tratamento de esgoto, ou onde este seja lançado diretamente em rios próximos das cidades. Em áreas rurais, geralmente, este molusco habita locais destinados à agricultura irrigada e ao cultivo de hortaliças, representando um hospedeiro intermediário importante para *S.mansoni* nessas regiões. As populações de *Biomphalaria* são instáveis e sofrem flutuações de acordo com a temperatura, sazonalidade e período de chuvas. Estes fatores climáticos interferem na dinâmica populacional destas espécies, onde o regime de chuvas controla o potencial biótico das populações de *Biomphalaria* (Teles; Carvalho 2008).

Quando estão em estado de dessecação oriundos da ausência de chuvas desenvolvem um comportamento chamado estivação ou anidrobiose, uma adaptação biológica para viver em regiões de seca e estiagens. Estimulado pela seca temporária dos habitats os moluscos secretam uma substância mucosa na

abertura das conchas. Os moluscos desidratam-se e as partes moles ficam reduzidas de 1/6 a 1/7 do seu volume normal diminuindo o seu metabolismo ocorrendo o consumo das reservas de carboidratos dos tecidos. O metabolismo de gastrópodes em estivação é parcialmente ou totalmente anaeróbico (Lima, 2010). São animais de grande fecundidade e fertilidade e em condições adequadas de luz, temperatura, pH e salinidade, reproduzem-se durante todo o ano, proliferando rapidamente no ambiente (Costa et al, 2004).

Segundo Kloos et al (2001), os fatores abióticos como a temperatura, tipo de substrato, velocidade da água, temporalidade da coleção hídrica, relações ecológicas com os demais seres vivos do ecossistema e a ação do homem neste ambiente, são variáveis extremamente relevantes para o ciclo biológico do molusco e para o seu papel como hospedeiro intermediário do *S.mansoni*.

1.4.3 - Morfologia das bionfalias: Estrutura Externa e Interna

1.4.3.1 - Filo Mollusca

Os moluscos são um dos maiores grupos do Reino Animal com uma extraordinária variabilidade de forma e adaptações funcionais e ambientais apresentadas pelos seus representantes. São animais de corpo mole, não segmentado, coberto por um manto, cabeça anterior, pé ventral e achatado, massa visceral dorsal e geralmente abrigada por uma concha. É o segundo maior grupo zoológico em número de espécies, devido à grande variedade de habitats marinhos e de água doce e terrestre apresentam sete classes (Souza; Lima, 1997).

1.4.3.2 - Classe Gastropoda

É a maior classe do Filo Mollusca. Possuem geralmente uma concha espiralada, mas pode ser reduzida ou ausente. Possuem sexos separados ou unidos, marinhos ou de água doce ou terrestre. São hospedeiros intermediários de helmintos parasitos do homem e de vários animais (Souza; Lima, 1997).

A concha dos moluscos é um produto da secreção do manto, consistindo de diferentes camadas de cristais de carbonato de cálcio depositadas em uma camada matriz orgânica (conchiolina), revestida externamente por uma cutícula de material

orgânico (periostraco) (Paraense,1970). Nos planorbídeos a concha é um cone enrolado em um mesmo plano ao redor de seu próprio ápice.

1.4.3.3 Gênero *Biomphalaria*

A concha do gênero *Biomphalaria* é constituída por um disco de periferia arredondada e diâmetro variável, de cor amarelo palha, no animal adulto e de acordo com as espécie, varia entre 7mm e 40mm e largura de 2mm a 15mm. Além da identificação baseada nos caracteres conquioliológicos e anatômicos, existem estudos genéticos e moleculares capazes de fornecer diagnóstico específico. As suas principais característica são: presença de dois tentáculos longos e filiformes; olhos na base dos tentáculos, boca contornada pela mandíbula, que apresenta a forma de um T, quando vista de frente. No colo apresenta as aberturas genitais: a masculina localiza-se atrás da base do tentáculo esquerdo e a feminina localiza-se um pouco mais atrás, sob a pseudobrânquia. O pé é oblongo. Quando o animal se movimenta livremente deixa exposta a massa cefalopodal unida pelo colo ao resto do corpo. Na porção cefálica da massa visceral, o manto dobra-se para formar a cavidade pulmonar (Thiengo; Fernandez, 2008) (Figura 1.4).

Quanto à *B. glabrata*, seu diagnóstico é feito através do manto pela presença de uma crista renal pigmentada sobre o tubo renal. Quando os indivíduos são jovens somente se observa uma linha pigmentada, sobre qual se desenvolverá a crista renal e um sistema reprodutor com bolsa vaginal bem definida. Concha com até 35mm de diâmetro e 11mm de largura (Thiengo; Fernandez, 2008) (Figura 1.5).

Biomphalaria tenagophila apresenta anatomia interna semelhante à *B.glabrata*, diferindo pela ausência de linha ou crista renal, com concha apresentando carena em ambos os lados, sendo mais acentuado a esquerda, com diâmetro até 35 mm de diâmetro e 11 mm de largura.

Biomphalaria straminea a concha mede de 16,5 mm de diâmetro a seis mm de largura,apresenta enrugamento na parede dorsal da vagina(enrugamento vaginal).

1.5 - Considerações sobre a Morfologia Interna

1.5.1 - Sistema digestório

O sistema digestório (Figura 1.4) compreende a massa bucal com as glândulas salivares, o esôfago, estômago com glândula digestiva e o intestino. A massa bucal tem aspecto de um bulbo e é toda revestida pelo saco bucal, que forma as paredes da cavidade bucal. No seu interior está a rádula que forma uma fita quitinosa de aspecto vítreo secretada continuamente pelo epitélio da matriz radular. Uma estrutura muito importante deste sistema é a glândula digestiva que se estende da região do piloro, para trás e sua porção posterior cobre a extremidade cefálica e um pouco do ovoteste (Paraense, 1970).

1.5.2 - Sistema Circulatório e Respiratório

Nos Planorbídeos, a hemolinfa circula em um sistema semi-aberto, impulsionada pelo coração, de onde parte a artéria aorta, que se ramifica para diversos tecidos, drenando nos seios venosos e retornando ao coração pelas veias pulmonar e renal, após ser re-oxigenado na parede pulmonar. O coração, envolto pela membrana do pericárdio, é dividido em duas câmaras, a aurícula, que recebe hemolinfa da cavidade pulmonar, e o ventrículo, que impele a hemolinfa através da aorta. A aorta se divide em duas artérias: a visceral, a qual irriga a parte posterior do corpo do caramujo, incluindo os sistemas digestivo e genital, e a cefálica, que atinge a toda região cefalopodal. As artérias se esvaziam nos espaços pseudovasculares dos tecidos, acumulando hemolinfa em três seios venosos: cefalopodal, visceral e sub-renal, retornando para o coração após circular pelo rim e pulmão. O sangue das bionfalarias e de outros planorbídeos, além de possuir células em suspensão, como de todos os moluscos, distinguem-se por conter hemoglobina dissolvida (Paraense, 1970).(Figura 1.4)

Quanto à respiração predomina a respiração atmosférica onde a hematose ocorre na rede vascular da parede pulmonar, de onde o sangue flui para o coração através da veia pulmonar. A respiração aquática ocorre através da pseudobrânquia e do tegumento em contato com o meio líquido (Thiengo; Fernandez, 2008).

Moluscos mais resistentes, aqueles que quando infectados eliminam poucas cercárias, exibem nos seus tecidos uma forte reação celular em torno dos esporocistos e cercárias em desenvolvimento. Essas reações de defesa são feitas por um tipo celular, hemócitos ou amebócitos, que são células móveis que fagocitam corpos estranhos e também secretam moléculas ativas contra os parasitos,

lembrando na sua forma e função, os macrófagos dos vertebrados (Barraco et al, 1993; Souza, 2006). Os hemócitos podem estar livres, circulantes na hemolinfa ou fixos nos tecidos.

1.5.3 - Sistema Reprodutor

As bionfalarias são animais hermafroditas que possuem na extremidade caudal uma glândula, ovoteste, que produz óvulos e espermatozoides simultaneamente. Em continuidade com o ovoteste está a vesícula seminal. Em seguida, os órgãos masculinos e femininos separam-se e seguem até as respectivas aberturas no lado esquerdo da extremidade cefálica. O canal da espermateca abre-se na vagina.

O sistema genital de *B.glabrata* pode ser subdividido em: órgãos genitais comuns (órgãos hermafroditas), genitália masculina e genitália feminina.

Os órgãos genitais comum consistem em um aumento de ramificações do ovoteste com o canal coletor e o ducto hermafrodita. Os ácinos do ovoteste são histologicamente e funcionalmente distinto a partir do canal coletor. O ducto hermafrodita apresentam células sexuais masculinas e femininas dentro do canal eferente (ducto dos espermatozoides) e o *carrefour* ou encruzilhada genital (Pan,1958).(Figura 1.6)

1.5.3.1 – Ovoteste

O ovoteste consiste em um número variável de ácinos que estão inseridos entre os divertículos e a glândula digestiva. Gametas masculinos e femininos são produzidos em todos os ácinos. Há produção dos dois tipos gametas que iniciam sempre simultaneamente. As paredes dos ácinos do ovoteste são compostas de um fino tecido conectivo, com duas ou três células densas, com abundantes fibras tipo colágeno sendo essas células morfológicamente semelhantes a fibroblastos (Geraerts; Joosse, 1984). Parte do epitélio próximo aos ácinos consiste de células ciliadas e não ciliadas.

1.5.3.2 - Oogênese

As células germinais no epitélio germinal que recobrem inteiramente a superfície dos ácinos se transformam em oogônia primária. Elas aumentam em número por divisões mitóticas, formando assim oogonia secundária, as quais se transformam em oocistos. Após a formação de um folículo ao redor da sua parte apical, eles crescem rapidamente devido a vitelogênese (de Jong-Brink et al, 1976). Nas bionfalarias, os oocistos contêm pouca quantidade de gema (conteúdo vitelínico) quando comparado a outros moluscos.

1.5.3.3 - Espermatogênese

A partir do epitélio germinal, na espermatogênese as células de Sertoli aumentam em volume. Pela técnica de microscopia eletrônica, espermatogônia em *Biomphalaria* pode ser identificada pela presença do fuso mitótico, que durante a espermatogênese está envolvida na transição da histona ou na formação de microtúbulos. As células mãe conduzem o desenvolvimento das células sexuais masculinas para a parte de baixo dos ácinos sobre os oocistos e das células foliculares (Geraerts; Joosse, 1984).

Possíveis funções das células de Sertoli são transporte, nutrição das células espermáticas e produção de hormônios. Medidas morfológicas destas células mostraram que o volume relativo da maioria das organelas decresce durante a espermatogênese, indicando uma diminuição geral da atividade das células. Com

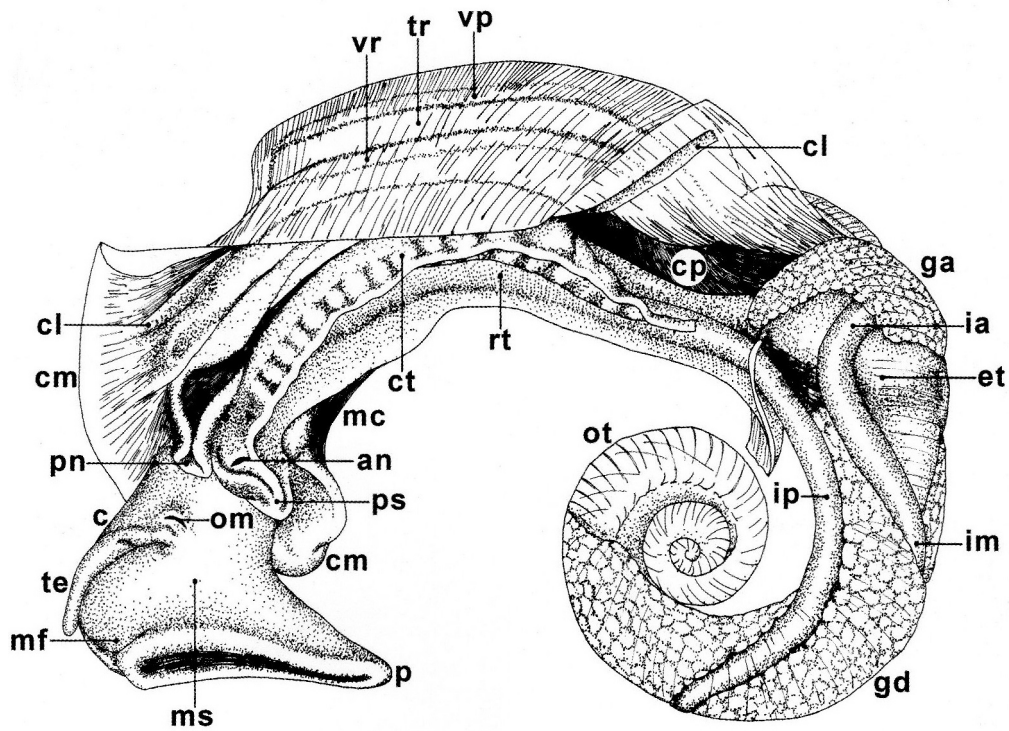
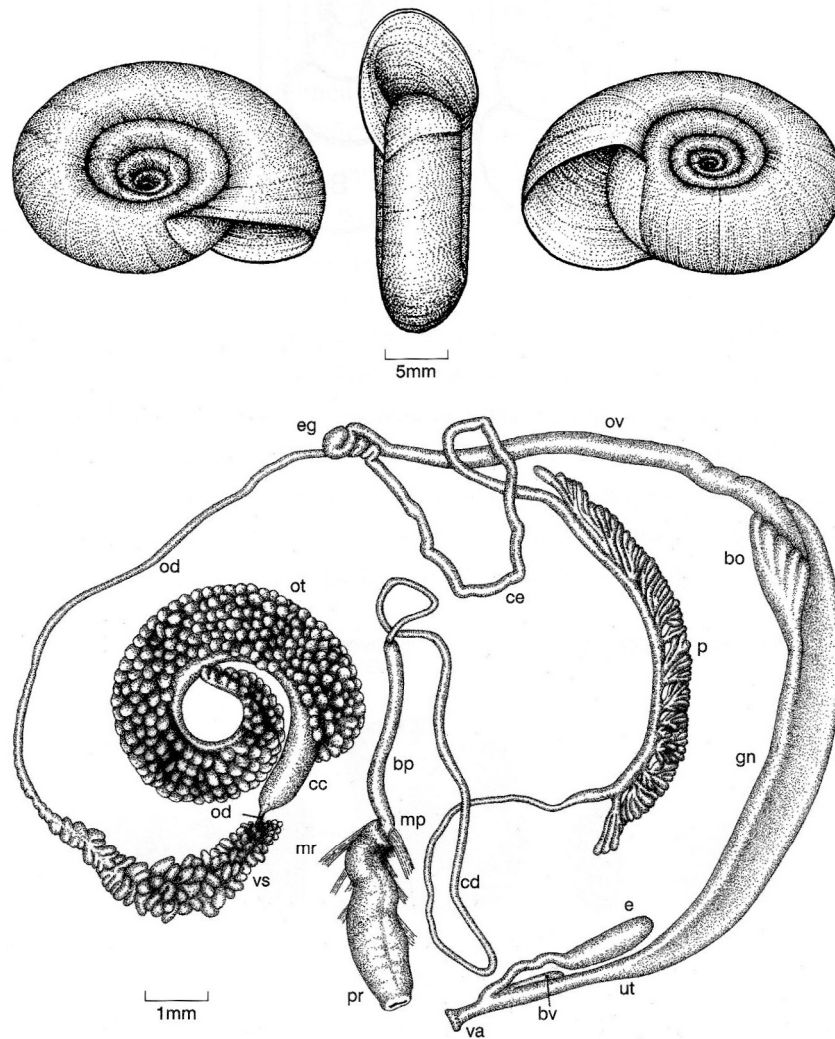


Figura 1.4 - *Biomphalaria*, animal retirado da concha com o manto, visualização dos órgãos internos. Massa cefalopodal (**ms**), cavidade pulmonar (**cp**), mufla (**mf**), tentáculo (**te**), colo (**c**), abertura genital (**om**), colar ou borda do manto (**cm**), pseudobrânquia (**ps**), pneumóstoma (**pn**), abertura anal (**an**), músculo columelar (**mc**), crista lateral (**cl**), crista retal (**ct**), veia renal (**vr**), veia pulmonar (**vp**), tubo renal (**tr**), reto (**tr**), glândula de albúmen (**ga**), intestino anterior (**ia**), intestino médio (**im**), intestino posterior (**ip**), estômago (**et**), glândula digestiva (**gd**), pé (**p**), ovoteste (**ot**). Fonte: (Thiengo e Fernandez 2008), (Paraense, 1976).

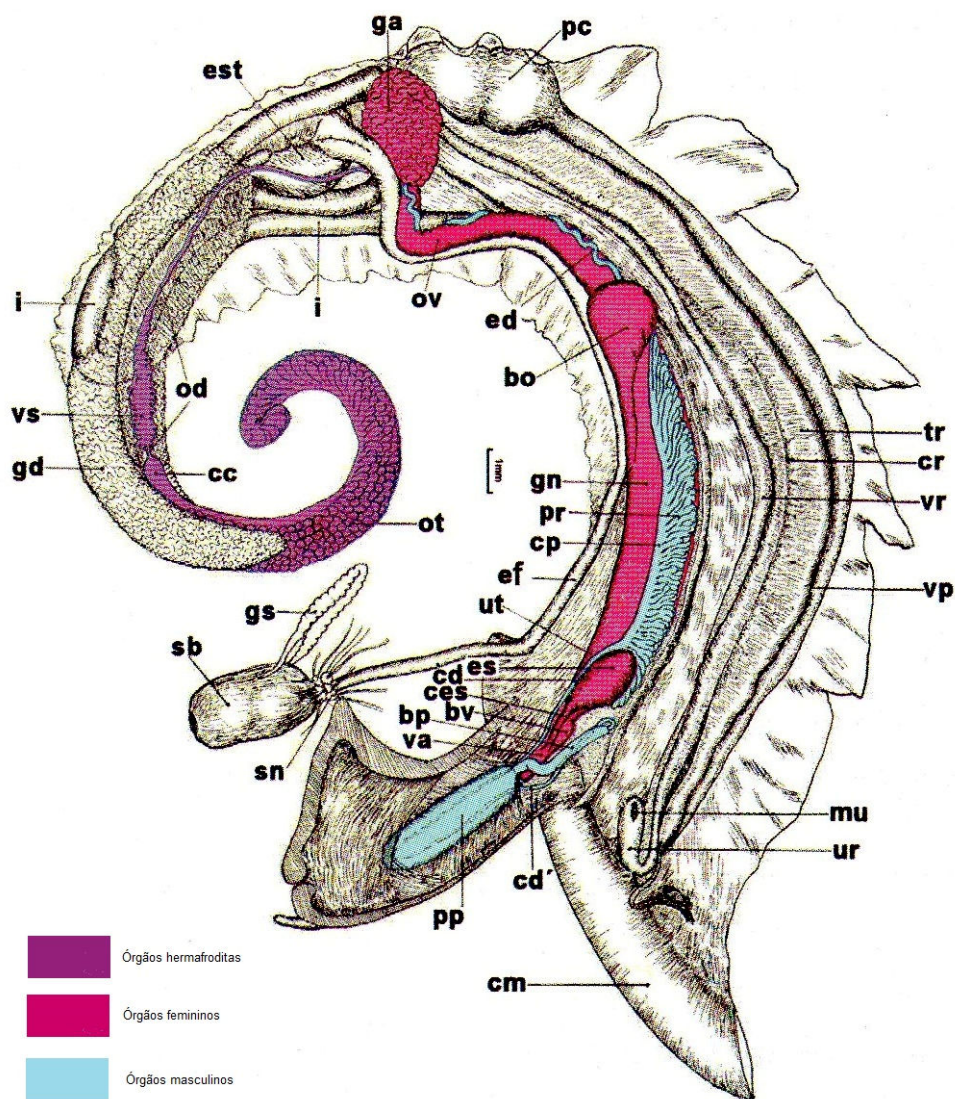


bo – bolsa do oviduto
 bp – bainha do pênis
 bv – bolsa vaginal
 cc – canal coletor do ovoteste
 cd – canal deferente
 ce – canal espermático
 e – espermateca

eg – encruzilhada genital ou *carrefour*
 gn – glândula nidamental
 mp – músculo protractor do prepúcio
 mr – músculo retrator do prepúcio
 od – ovispermiduto
 ot – ovoteste

ov – oviduto
 p – próstata
 pr – prepúcio
 ut – útero
 va – vagina
 vs – vesícula seminal

Figura 1.5 - *Biomphalaria glarata* com a concha e sistema genital. Fonte: Paraense, 2008.



Órgãos hermafroditas

- cc – canal coletor do ovoteste
- od – ovispermiduto
- ot – ovoteste
- vs – vesícula seminal

Órgãos femininos

- bo – bolsa do oviduto
- bv – bolsa vaginal
- ces – canal da espermateca
- es – espermateca
- ga – glândula do albume
- gn – glândula nidamental
- ut – útero
- va – vagina

Órgãos masculinos

- bp – bainha do pênis
- cd, cd' – canal deferente
- ed – canal espermático
- cp – canal prostático
- pr – próstata
- pp – prepúcio

Demais órgãos

- cm – collar do manto
- cr – crista renal
- ef – esôfago
- est – estômago
- gd – glândula digestiva (hepatopâncreas)
- i – intestino
- mu – meato do ureter
- pc – pericárdio
- sb – saco bucal
- sn – sistema nervoso central
- tr – tubo renal
- ur – ureter
- vp – veia pulmonar
- vr – veia renal

Figura 1.6 – *Biomphalaria* parcialmente dissecada mostrando a interação entre os órgãos. Fonte: Thiengo e Fernandez (2008) e Paraense (2008)

base em observações de histoquímica e de ultraestrutura, de Jong-Brink et al (1977) mostraram que as células de Sertoli estão envolvidas com a nutrição das células espermatogênicas. Além disso, estes autores afirmaram que é pouco provável a produção de hormônios por estas células.

Divisões mitóticas da espermatogônia produzem outras espermatogônias com núcleos relativamente grandes. A espermagônia multiplica-se e então se desenvolve em espermatócitos. Elas sofrem meiose resultando em espermátides de primeiro estágio. As espermátides mostram vários estágios de diferenciação durante o processo de espermiogênese. Elas mudam gradualmente de células redondas grandes para espermatozóides extremamente alongados. O processo de diferenciação inclui condensação, alongamento, espiralização dos núcleos e a formação de acrossoma e da cauda (Pan, 1958; de Jong- Brink et al,1977).

1.5.3.4 - Os Ductos e Glândulas Acessórias

Os gametas são liberados dentro do ducto hermafrodita, que pode ser dividido em três regiões: uma região proximal estreita, uma região distal estreita e uma região intermediária na qual o esperma é estocado (em animais maduros).

O *carrefour* é uma junção do ducto hermafrodita com os tratos macho e fêmea. O ducto da glândula de albúmen também abre neste ponto e a bolsa de fertilização, se presente, está associada com esta estrutura. Na cópula, o esperma passa através dessa região e é transportado para dentro do ducto do macho. Quando ocorre a fertilização cruzada, os oocistos ovulados são fertilizados pelos espermatozóides externos, os quais ascenderam do trato feminino e, provavelmente, são estocados na bolsa. A fertilização, contudo, ocorre na região distal do ducto hermafrodita. Em seguida, cada zigoto é envolvido por um fluido perivitelínico secretado pela glândula de albúmen e passa para dentro do oviduto para receber as membranas terciárias. A glândula de albúmen nas bionfalarias é única glândula de formato esferoidal tendo uma estrutura tubular composta por extensas células secretoras e intercalada por células ciliadas. Métodos ultraestrutural, histoquímico e bioquímico demonstraram a presença de galactogênio e de proteínas nos grânulos secretórios da glândula de albúmen (Geraerts; Joesse, 1984). A quantidade de fluido perivitelínico por ovo é constante dentro de cada espécie, indicando que a glândula

albúmen libera seu produto como pequenas gotas de tamanhos iguais. A massa ovígera é uma fina camada que serve para aderir o conjunto de ovos ao substrato e é depositado na superfície da ooteca pelas células localizadas ao redor da abertura genital. A massa de ovos é extrusada através da musculatura da vagina (Geraerts; Joosse,1984; Paraense,1970). Segundo Geraerts e Joosse, 1984 encontrou em seu trabalho dois tipos de células secretoras, ambas produzindo uma glicoproteína dispersa no epitélio ciliado envolvendo a vagina de *Biomphalaria glabrata*.

1.5.3.5 - Ducto Espermático, Glândula Prostática, Vasos Deferentes e Complexo Peniano

Em *Biomphalaria*, o ducto masculino não está completamente separado e os vasos deferentes estão presentes como um sulco ciliado que é, provavelmente, separado funcionalmente a partir do trato feminino. Na maioria dos casos o ducto corre separado do *carrefour* para o pênis. Apresenta uma glândula prostática que é uma dilatação dos vasos deferentes. Durante a copulação, o pênis é dilatado pela eversão. Isso envolve o uso da pressão sanguínea através das camadas dos complexos músculos finais que estão presentes para criar uma pressão hidrostática. O pênis é colocado na bainha do pênis e ele é evertido pelo prepúcio (Geraerts; Joosse,1984; Paraense,1970).

1.6 - Biologia Reprodutiva

Durante a cópula, um dos indivíduos atua como macho e outro com fêmea, raramente ocorrendo cópula cruzada. Os espermatozoides introduzidos durante a cópula no canal genital feminino de um molusco (espermatozoides exógenos) são armazenados no ovoteste e na sua espermateca. No ovoteste ocorre a fecundação cruzada e supõe-se que a autofecundação ocorra na vesícula seminal. Os espermatozoides que se acumulam no ovoteste podem conservar a capacidade de fecundar por até 68 dias (Paraense,1955,1956,1976). Em populações de campo e de laboratório, a preferência é pela fecundação cruzada (Costa et al, 2004). Quanto à fecundidade, o número de ovos por desova varia de 1 a 100 e a eclosão geralmente se inicia 7 dias após a postura.

Dentre os estudos sobre a biologia dos planorbídeos e seus aspectos reprodutivos, principalmente do gênero *Biomphalaria*, a maioria dos trabalhos envolve moluscos não infectados e geralmente correlacionam aspectos reprodutivos com temperatura, composição química do meio, composição da alimentação (Penido et al, 1951; Paraense,1955; Perlowagora, 1958; Barreto, 1960; Michelson,1961; Ritchie et al, 1966; Andrade et al, 1973). Outros autores comparam os moluscos em espécies intra- e interespecíficas em autofecundação e fecundação cruzada (Paraense, 1955; Kawazoe, 1977; Rozemberg et al, 1992; Motta; Mello 1997; Freitas et al, 1997; Mello-Silva et al, 1998 e Costa et al, 2004). Para *B. glabrata* infectada, os trabalhos existentes abordam estudos em relação a diminuição da fecundidade em função da infecção. Pan (1965) observou que a produção de ovos dos moluscos adultos declinou durante a 4^a e 5^a semana após a infecção e logo após este período cessaram a reprodução. Resultados similares foram obtidos por Etges; Gresso (1965) que notaram um decréscimo da fecundidade iniciando-se entre os 23^o e 29^o dias após a infecção. Méier e Méier-Brook (1981) observaram uma diminuição da fecundidade em moluscos imaturos com número de massas ovíferas menor e com poucos ovos por massa. Crews; Yoshino (1989) utilizaram moluscos sexualmente maduros e observaram uma redução do número de ovos por moluscos entre o 14^o e 21^o dia após a exposição. Minchella; Loverde (1981) utilizaram moluscos *B. glabrata* com maturidade sexual e observaram um aumento na produção de ovos dos expostos no 7^o, 14^o e 21^o dia após a infecção quando comparados aos não expostos. No entanto, os moluscos expostos, mas que não estavam parasitados, diminuíram a produção de ovos mantendo o seu nível igual aos do controle durante a 4^a e 5^a semanas. Thornhill et al, (1986) compararam um grupo de moluscos expostos com não expostos mostrando um aumento significativo na média do número de ovos/desovas durante o período de 14-21 e 22 -28 dias após a exposição. Além disso, estes autores observaram que a oviposição foi totalmente suspensa 5^a a 6^a semanas após a infecção.

Em relação à infecção de *B. glabrata* por *S. mansoni* e a redução da fecundidade, várias teorias são discutidas para explicar de forma mais consistente os prejuízos causados pela infecção. Minchella (1985) ressalta que um hospedeiro infectado por um parasito geralmente sofre redução do sucesso reprodutivo, aumentando a mortalidade e reduzindo ou inibindo completamente sua reprodução e que a infecção parasitária no hospedeiro é influenciada por fatores genéticos e ambientais. Ainda dentro desta mesma discussão, ele coloca que um hospedeiro

resistente ou suscetível para um parasito terá na verdade dois caminhos dentro dessa interação: o hospedeiro pode ser incompatível com o desenvolvimento do parasito e permanece não infectado ou o parasito tem sucesso invade e reduz significativamente o sucesso reprodutivo do hospedeiro.

1.6.1 - Alterações no Conteúdo de Glicogênio da Glândula Digestiva e Massa Cefalopodal em Moluscos Infectados por Trematódeos

A glândula digestiva é o órgão preferencialmente colonizado pelos esporocistos, que é a forma larvar intra-molusco do *S.mansoni*. Nos gastrópodos pulmonados, o metabolismo energético é baseado em polissacarídeos (Joosse; van Elk, 1986). No caso, o glicogênio é o polissacarídeo de maior importância e mais abundante encontrado nos moluscos. Além da glândula digestiva, o glicogênio é encontrado em grande quantidade na massa cefalopodal e no manto (Pinheiro et al, 1994). O glicogênio é um polímero de α -D-glicose que consiste em uma cadeia de ligações lineares α (1,4) e grande número de ramificações formadas através de ligações α (1,6). O glicogênio, pode ser encontrado nas células animais em grânulos citoplasmáticos semelhantes aos do amido nas células vegetais (Campbell; Farrell, 2008). A função básica da molécula de glicogênio é armazenamento de glicose, o substrato mais prontamente utilizável no processo de obtenção de energia pelos animais. Sendo assim, quando em momentos de alta demanda energética ou em condições fisiológicas de estresse, o glicogênio pode ser degradado por enzimas específicas (glicogênio fosforilase) para originar a glicose livre, onde será extraída a energia necessária para a manutenção de seus processos vitais, no caso por via aeróbica (respiração celular) ou por via anaeróbica (fermentação) (Pinheiro, 2003). O glicogênio é encontrado em células especiais que o armazenam, entre os ácidos da glândula digestiva e gônadas (de Jonk-Brink, 1973).

Joosse e Elk 1986 observaram um acúmulo de glicogênio na massa cefalopodal e no manto de *Lymnaea stagnalis* (Linnaeus 1758) infectada com *Trichobilaharzia ocellata* até os 47 dias infecção e logo em seguida decresceu. Para os moluscos infectados apresentaram padrões semelhantes aos do controle.

Pinheiro e Amato 1994 estudaram o efeito da infecção de *Bradybaena similaris* (Férussac 1821) com *Euritrema coelomaticum* (Giard & Billet, 1892) através de medidas do conteúdo de glicogênio na massa cefalopodal e glândula digestiva.

Houve uma redução de 50% deste carboidrato durante o desenvolvimento intramolusco nos primeiros períodos de infecção.

Pinheiro et al (2009) estudaram as interações fisiológicas de *Lymnaea columella* (Say, 1917) infectada com *Echinostoma paraensei* (Lie & Basch, 1967) observaram que o conteúdo de carboidratos contidos na glândula digestiva diminui depois de 20 dias após a infecção com uma redução de 58,90% em relação ao controle e que na massa cefalopodal esse decréscimo foi somente de 13,68%.

1.6.2 - Alterações no Nível de Glicose na Hemolinfa de Moluscos Infectados por Trematódeos

A glicose é o monossacarídeo mais abundante na hemolinfa de *B. glabrata*, organismo que apresenta uma organização citofisiológica de mitocôndrias, ciclo de Krebs funcional e metabolismo aeróbico.

Em condições de infecção por *S. mansoni*, a hipoglicemia em *B. glabrata* é resultado comum, pois o *S. mansoni* é capaz de utilizar a glicose do molusco diminuindo também os níveis de glicogênio. Estudos realizados através de determinações histoquímicas, observaram pouca ou nenhuma glicose livre no corpo das cercárias, o que demonstra a rápida utilização destes monossacarídeos nos processos de obtenção de energia e sua armazenagem sob forma de glicogênio (Ferreira, 2006). Devido a esta grande necessidade de glicose, é que os esporocistos se localizam na glândula digestiva de seus hospedeiros. Segundo Becker (1980), há neste órgão uma circulação especial de hemolinfa rica em nutrientes. Quando as formas larvárias chegam até a glândula digestiva, elas estão banhadas pela hemolinfa, da qual tiram parte de seus nutrientes e na qual excretam. Em função disso, é observado uma elevada taxa metabólica evidenciada por estudos histoquímicos e fisiológicos (Ferreira, 2006). Sendo assim, a composição da hemolinfa é alterada em decorrência da infecção.

Becker (1968) demonstrou que a adição de glicose em esporocistos filhos de *S. mansoni*, *in vitro*, resultou num aumento significativo do tempo de sobrevivência. A partir de então, outros trabalhos foram realizados, nos quais foi observado um significativo decréscimo nos níveis deste carboidrato na hemolinfa de *B. glabrata* infectada com *S. mansoni* (Cheng; Lee, 1971; Stanislawsky; Beker, 1979). As

observações destes autores sugerem que a glicose é um substrato essencial para a obtenção de energia pelos estágios larvais dos trematódeos.

1.6.3 - Alterações no Conteúdo de Carboidratos e Histoquímica da Glândula de Albúmen por Moluscos Infectados por Trematódeos

Segundo Azevedo et al (1996), o galactogênio foi primeiro descrito por Hammarstein (1885) que observou a existência de uma “glicoproteína” nos extratos da glândula de albúmen de *Helix sp.* e a denominou sinistrina, devido a sua propriedade levo-rotatória. Porém, segundo o mesmo autor, Levene (1925) demonstrou que a sistrina era, na realidade, um polissacarídeo composto por galactose ou acetilgalactose e que a proteína observada por Hammarstein era apenas uma impureza. Este fato foi posteriormente, confirmado por May (1931) que constatou ser o polissacarídeo estudado por ele um polímero de galactose, propondo o nome de galactogênio para o mesmo.

O galactogênio é um homopolímero de galactose com várias propriedades. Em *B. glabrata*, o galactogênio é formado por 36% de L-galactose e 64% de D-galactose (Livingstone; Zwaan, 1983). Nos moluscos pulmonados adultos, o galactogênio está restrito à glândula de albúmen e aos ovos, servindo como uma fonte especializada de energia no processo de reprodução animal (Pinheiro, 2003). A glândula de albúmen fornece o principal recurso nutricional para o desenvolvimento dos ovos: o fluído perivitelínico, rico em galactogênio.

Registros de alterações no funcionamento da glândula de albúmen de moluscos parasitados por larvas de trematódeos têm sido encontrados com frequência na literatura (Joose et al, 1988; Pinheiro et al, 1994). No entanto, estudos histopatológicos correlacionando alterações de polissacarídeos em função da infecção são mais raros.

Joose et al (1988) realizaram um estudo *in vitro* sobre a atividade sintética da glândula de albúmen de *L. stagnalis* incubadas em presença de hemolinfa de moluscos infectados com *T. ocellata*. Os autores observaram que a atividade foi significativamente reduzida a um valor cerca de 50% menor do que aquele observado nos animais do grupo controle após uma hora de incubação.

Cousin et al (1995) estudaram *B. glabrata* não susceptível para o *S. mansoni* e com baixo potencial reprodutivo. Ao examinar o trato reprodutivo desses moluscos por microscopia de luz e eletrônica, os autores observaram anormalidades na glândula de albúmen.

Crews e Yoshino (1990) estudaram o modelo *B. glabrata* e *S. mansoni* e não constataram alterações significativas na síntese de polissacarídeos, especificamente de galactogênio, quando analisados *in vivo*. Somente quando a glândula de albúmen isolada foi incubada em presença de hemolinfa de moluscos com 28 dias de infecção, uma redução foi observada, porém esta não apresentou significância estatística.

1.6.4 - Desenvolvimento do *Schistosoma mansoni* na Fase Intra-Molusco e seus Aspectos Histopatológicos

No desenvolvimento larvário do *S. mansoni* dentro dos moluscos hospedeiros, vários aspectos têm sido estudados, porém alguns autores focaram em estudar a relação parasito-hospedeiro com observações histológicas. Pan (1965) estudou detalhadamente a interação hospedeiro-parasito em *B. glabrata* infectada com o *S. mansoni*. O autor fez observações importantes sobre a histologia e histopatologia do molusco, locais de desenvolvimento do parasito, mudanças patológicas produzidas nos moluscos, efeito no crescimento, fecundidade e causas da mortalidade. Segundo Pan (1965), somente uma pequena parte dos miracídios que penetram no molusco se desenvolvem até esporocistos primários e geralmente estão localizados no pé. O miracídio, ao penetrar, perde as glândulas de adesão e penetração e continua a perder outras estruturas. O miracídio se transforma em um saco, com paredes cuticulares contendo a geração de células germinativas que iniciam um intenso processo de multiplicação. Decorrido cerca de 72 horas após a penetração, a larva denominada esporocisto primário ou esporocisto mãe, dobra de tamanho. Após a segunda semana depois da penetração ocorre transformações no interior do esporocisto. Em temperaturas de 25 a 28°C, a formação de esporocistos secundários inicia-se a partir do 14º dia após a penetração do miracídio. A migração do esporocisto secundário se inicia em torno do 18º dia após a saída do esporocisto primário, através de um provável poro de nascimento. A migração, a partir do local de penetração do miracídio, onde a maioria se desenvolve, até a glândula digestiva

ou hepatopâncreas, leva 2 a 3 dias. Os esporocistos se localizam nos espaços intercelulares da glândula digestiva ou eventualmente no ovoteste.

Souza et al (1997) fizeram um estudo histopatológico comparativo para *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea* infectada com uma única cepa. *B. glabrata* apresentou frequentemente proliferação de granulomas focal com proliferação de amebócitos em vários órgãos. Por outro lado, *B. tenagophila* e *B. straminea* apresentaram somente raras mudanças reativas, sugerindo que o mecanismo de resistência para a infecção com miracídios provavelmente seguiu diferentes caminhos nas três espécies estudadas. Ainda com o objetivo de comparar o desenvolvimento do *S.mansoni* na fase intra-molusco nas três espécies acima, Souza et al (1995) através de cortes histológicos, observaram que nenhuma larva foi encontrada nos moluscos 72 horas após a exposição. No entanto, nos moluscos que eliminavam cercárias após 31 dias de exposição foram observadas reações teciduais de encapsulamento para *B. tenagophila* e *B. straminea* no colar do manto, região cefalopodal e ductos renais. Porém, *B.glabrata* apresentou numerosos esporocistos e cercárias sem reação tecidual na glândula digestiva e outros órgãos.

Borges et al (1998) demonstraram através da histopatologia que a resistência e a susceptibilidade das bionfalarias infectadas com *S.mansoni* estão atreladas a influência genética na resistência. No caso de *B.glabrata* da geração F-15 após três meses sem eliminar cercárias, quando esses moluscos foram submetidos a exames histopatológicos não apresentavam esporocistos e sim um quadro surpreendente de reatividade de amebócitos. Os autores consideraram que isso consistiu basicamente em uma proliferação focal e difusa de amebócitos acompanhando a expansão da matrix extracelular, que às vezes, simula o processo de fibrose observado em tecidos de vertebrados.

Lemos e Andrade (2001) realizaram uma análise sequencial das alterações histológicas surgidas em decorrência da infecção com *S. mansoni* e somente aos 67 dias de infecção uma pequena reação focal com um acúmulo de hemócitos foi observada nos sítios de desenvolvimento dos esporocistos e cercárias, ocasionando, muitas vezes, a destruição dos parasitos. Ao final do experimento, as lesões se tornaram mais disseminadas, alcançando o rim, a glândula digestiva e o ovoteste.

1.6.5 - Maturidade Sexual e Crescimento

A maturidade sexual e o crescimento são alvos de vários trabalhos onde alguns autores relacionam as duas condições em função da infecção. Um exemplo é o gigantismo que pode ser visto como um resultado adotado como uma estratégia de prolongamento da vida, porém, retardando a reprodução em moluscos infectados (Minchella, 1985).

Paraense (1972) observou que a primeira oviposição nos indivíduos imaturos foi observada aos dez dias em *B.glabrata* e 24 dias para *B.straminea*. Com cerca de 30 dias, os moluscos alcançaram a maturidade sexual e começaram a desovar. Segundo o autor, um só indivíduo produziu, em poucos meses, cerca de milhares de descendentes.

Segundo Pan (1965), nos moluscos jovens infectados, o crescimento é significativamente maior do que os controles. Esta observação foi também confirmada por Thornhill et al (1986) para moluscos a partir do 28º dia de exposição.

Meier e Meier-Brook (1981) observaram que em *B. glabrata* jovem infectada com *S.mansoni*, o desenvolvimento dos órgãos reprodutores masculinos em relação ao diâmetro da concha, foi particularmente retardado em animais infectados antes da maturidade sexual e alterando e retardado o crescimento.

1.7 - Castração Parasitária

Embora o termo “castração parasitária” seja bastante discutido e questionado na língua portuguesa, não foi proposto ainda nenhum termo mais apropriado para a tradução de “castration parasitic” comumente utilizado na língua inglesa. Assim, será mantido neste trabalho o termo “castração parasitária”.

Segundo Beck (1980), o termo castração parasitária foi utilizado pela primeira vez por Girard (1888) e referia-se a reversão sexual que ocorre em machos do gênero *Palaemon* quando parasitados por isópodes do gênero *Bopyrus*.

Mclelland e Bours (1969) atestaram que a castração pode fazer parte de um processo primário de adaptação do hospedeiro ao parasito. Segundo esses autores, a castração serve para poupar os moluscos do gasto duplo da produção de seus

ovos e desenvolvimento das cercárias. Porém mais tarde, esta idéia foi bastante controversa e rejeitada, pois Baudoin (1975) definiu a castração parasitária como “a destruição ou alteração dos tecidos da gônada pelos parasitos” e fez também uma extensa revisão sobre o fenômeno em vários relacionamentos parasito/hospedeiro. Alguns autores citados por ele, afirmam que a seleção é unilateral, onde o parasito castra o hospedeiro, ou o inibe o crescimento de suas gônadas, no caso de moluscos jovens, e assim, os moluscos mais suscetíveis não se reproduzem e são eliminados da população. Para Malek e Gheng (1974) a castração era definida em termos de inibição total ou parcial da gametogênese do hospedeiro. Kuris (1973) sugeriu que parasitos castradores regulam sua população hospedeira, como predadores ou parasitóides, diretamente reduzindo a capacidade reprodutiva da população.

Mais tarde Baudoin (1975) classificou a castração em (1) direta, através da interferência direta com as gônadas; 2) indireta, por desvio de nutrientes que seriam utilizados para o desenvolvimento e manutenção das gônadas e 3) indireta por mecanismos hormonais. Porém, Sullivan et al (1985) reuniram os tipos de castração parasitária em dois grupos apenas: 1) aquele onde a castração é um efeito primário, onde as larvas do trematódeo, em algum momento do seu ciclo biológico se desenvolvem no tecido gonadal, sendo muito pronunciado nas espécies de trematódeo com estágio de rédia; e 2) a castração com efeito secundário, decorrente de alterações que sejam causadas no organismo do hospedeiro em decorrência da presença dos estágios larvas, tais como: alterações no seu metabolismo, a drenagem de nutrientes, obstrução dos seios hemolinfáticos que nutrem as gônadas ou interferência com o sistema neuroendócrino do molusco. Assim, a castração pode ser entendida como qualquer alteração na função reprodutiva do molusco que seja decorrente da interferência das larvas em desenvolvimento em seu interior, podendo levar a interrupção completa da atividade ovipositória ou apenas causar a sua redução. Pode ainda levar à destruição permanente da gônada ou bloquear temporariamente o processo de gametogênese (Pinheiro, 2003).

O fenômeno da castração parasitária apresenta-se de formas variadas, mesmo quando os estudos são realizados com modelos semelhantes de interação parasito/hospedeiro, e muitas vezes contraditórios e incompletos.

Brumpt (1941) estudou a biologia dos hospedeiros do *S.mansoni* e notou que nos moluscos parasitados, houve uma diminuição da oviposição sem observar a castração parasitária completa. Já Coelho (1954) ao comparar moluscos infectados com *S.mansoni* com os não parasitados, observou uma inibição na função reprodutora, com menor número de desovas e de ovos nos moluscos parasitados. Essa inibição levou a acreditar que os moluscos infectados se “comportaram como animais castrados” pelo menos depois de decorrido algum tempo da infecção. Porém, logo após, em um determinado momento da infecção foi observado que os moluscos voltaram a ovipor e através de cortes histológicos foi observada uma reorganização do ovoteste.

Sturrock e Sturrock (1970) estudando *B. glabrata* de St. Lúcia infectada com *S. mansoni* e o controle, observaram que produção de ovos dos infectados declinou rapidamente durante o período pré-patente e parando completamente dentro das primeiras semanas do período patente.

O processo da castração parasitária foi demonstrado por Thornhill et al (1986). Estes autores atestaram que moluscos expostos a miracídios de *S.mansoni* mostraram um significativo aumento no número médio de ovos e desovas postos durante os períodos de 14^o a 21^o e 22^o a 28^o dias de infecção, sendo este parâmetro inferior deste ponto em diante. Na verdade, estes resultados podem ter sofrido a influência da presença de moluscos expostos e não parasitados, uma vez que nem todos os organismos expostos aos miracídios desenvolveram a infecção. No caso, o presente trabalho não separou os moluscos positivos, com isso na sua quantificação, ao analisar os animais expostos, incluiu informações acerca da atividade reprodutiva dos moluscos que desenvolveram cercárias e dos em que o desenvolvimento larvar intramolusco não foi bem sucedido.

Crew e Yoshino (1989) expuseram *B. glabrata* sexualmente madura a 12 miracídios do *S.mansoni*. A castração foi medida pela redução da média do número de ovos por molusco, que ocorreu entre 14^o e 21^o dias após a exposição. A redução da fecundidade nos moluscos infectados coincide com a migração e o estabelecimento dos esporocistos filhos na glândula digestiva e na gônada. Ovócitos individuais foram observados em cortes longitudinais do ovoteste, revelando que moluscos não infectados continham mais ovócitos por corte do que os moluscos infectados nos 27^o, 31^o e 40^o dias de infecção. A média da área da gônada dos

moluscos controles aumentaram por volta do 40º dia após infecção, quando comparados com os infectados. Porém, o número de ovócitos/mm² de gônada não variou significativamente ao longo do período estudado, exceto aos 14 dias de infecção quando estes parâmetros mostraram-se mais elevados nos animais infectados.

Bai et al (1997) observou a ação da fenoloxidase na produção dos ovos de *B.glabrata* infectados e controle. Foi constatado que tanto a atividade da enzima total como da enzima específica na glândula de albúmem nos moluscos infectados foram significativamente diminuído entre 28 e 33 dias posinfecção. Quando comparados ao grupo controle a atividade dessas enzimas diminui levando a castração parasitária desses moluscos.

Estudos com outros modelos da interação parasito/hospedeiro têm sido realizados. Como exemplo, temos Sullivan et al (1985), que estudaram a castração parasitária do molusco *Ilyanassa obsoleta* infectada com várias espécies de trematódeos larvais e observaram que nos moluscos infectados as gônadas podem estar presentes, mas em uma condição reduzida ou imatura, ou seja, apesar da idade do molusco, o amadurecimento sexual não ocorreu, o que pode refletir o estágio do seu ciclo reprodutivo em que a infecção se deu, onde os parasitos podem causar a regressão dos túbulos imaturos ou evitar o seu amadurecimento.

Schalling et al (1991) estudaram *Lymnaea stagnalis* infectada com Schistosomatidae *Trichobilharzia ocellata*. Os autores observaram que os moluscos infectados no estágio subadulto de seu ciclo de vida produziram muito mais massas de ovos entre a segunda e a quarta semana de infecção que os moluscos não infectados. Porém após esta fase, o número de desovas foi reduzido, sendo significativamente menor do que nos animais não infectados a partir da quinta semana de observação. Os animais infectados quando adultos, produziram o mesmo número de massa de ovos que os animais controle.

Hurd (2001), em seu extenso artigo de revisão utilizou moluscos infectados para exemplificar o processo da castração. Ela propõe que a redução ou cessação na produção dos ovos pelo hospedeiro pode ser uma consequência direta patológica induzida pelo parasito ou que a castração pode ser um resultado da infecção ou uma simples estratégia adaptativa por parte do parasito ou do hospedeiro.

Zang et al (2009) estudaram a ação do schistosomina que é um neuropeptídeo excretado pela larva no interior dos moluscos responsável pela redução ou cessação da fecundidade. Ao compararem a expressão deste neuropeptídeo nos modelos *Biomphalaria glabrata* infectada com *S.mansoni* e *Echinostoma parensi* não foi observada elevadas expressões da schistosomina tanto no período pré patente e patente da infecção. Sugerindo que a função da schistosomina na castração parasitária não esta bem estabelecida na infecção com as duas espécies de trematódeos.

Lafferty e Kuris (2009), em um artigo de revisão, interpretam a castração como uma resposta para o dilema entre o consumo e longevidade enfrentados pelos parasitos. Castradores parasitários comuns incluem larvas de trematódeos em moluscos, parasitos de isópodos e craca de crustáceos. Afirmam também que a competição intra- e interespecífica entre o castrador e o hospedeiro é geralmente intensa, porque um castrador parasitário pode usurpar toda a energia reprodutiva do hospedeiro e esta energia é limitada. Estes parasitos podem ser abundantes e podem deprimir substancialmente a densidade populacional do hospedeiro. Populações de hospedeiros sujeitos as altas taxas de castração parasitária parecem alcançar a maturidade mais rapidamente.

Desta forma, o objetivo desta tese foi estudar o processo da castração parasitária em *B. glabrata* infectada com *S. mansoni* através da investigação de aspectos biológicos, histológicos e bioquímicos.

2 - JUSTIFICATIVA

Uma recomendação constante nos trabalhos que lidam com moluscos transmissores da esquistossomose é a necessidade de se aprofundar os conhecimentos básicos de sua taxonomia, ecologia, biologia e respostas aos fatores ambientais com vistas a subsidiar as ações de compreensão da dinâmica de transmissão. Os estudos sobre a fisiologia, reprodução e metabolismo dos moluscos hospedeiros têm contribuído para elucidação dos fatores envolvidos na dinâmica da transmissão. Sendo assim, em função da grande importância epidemiológica de *B. glabrata*, novos conhecimentos sobre esses aspectos em sua interação com *S.*

mansoni, poderão auxiliar na compreensão dos mecanismos envolvidos na dinâmica populacional desses moluscos.

3 - OBJETIVOS

3.1 - Objetivo Geral

Estudar os aspectos biológicos, bioquímicos e histológicos da reprodução de *Biomphalaria glabrata* infectada por *Schistosoma mansoni*.

3.2 - Objetivos Específicos

- 1) Estudar a fecundidade e fertilidade dos moluscos infectados e não infectados com *S.mansoni*;
- 2) Estudar as alterações histopatológicas na glândula digestiva e ovoteste nos moluscos parasitados por *S.mansoni*;
- 3) Determinar as concentrações de carboidratos: glicogênio na glândula digestiva e na massa cefalopodal; glicose na hemolinfa;
- 4) Verificar através da análise histológica, possíveis alterações do conteúdo de polissacarídeos na glândula de albúmen.

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - Manutenção dos Moluscos em Laboratório

Os moluscos utilizados neste trabalho são oriundos do município de Ressaca, BH, Estado de Minas Gerais, Brasil (19° 86` 042" S 43° 99` 67" W) e foram mantido em aquários de vidro de 2 litros a temperatura de 25±1°C. Como alimento foi oferecido alface fresca *ad libitum*.

S. mansoni (linhagem BH) foi obtido de uma linhagem de origem humana e que vem sendo mantida no Laboratório de Malacologia, do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, RJ, pela passagem em camundongos "Swiss Webster" albinos (Fernandez; Pieri, 2001). Os procedimentos para a coleta de fezes dos

camundongos infectados e para a exposição dos moluscos aos miracídios foram as descritas por Paraense e Corrêa (1989).

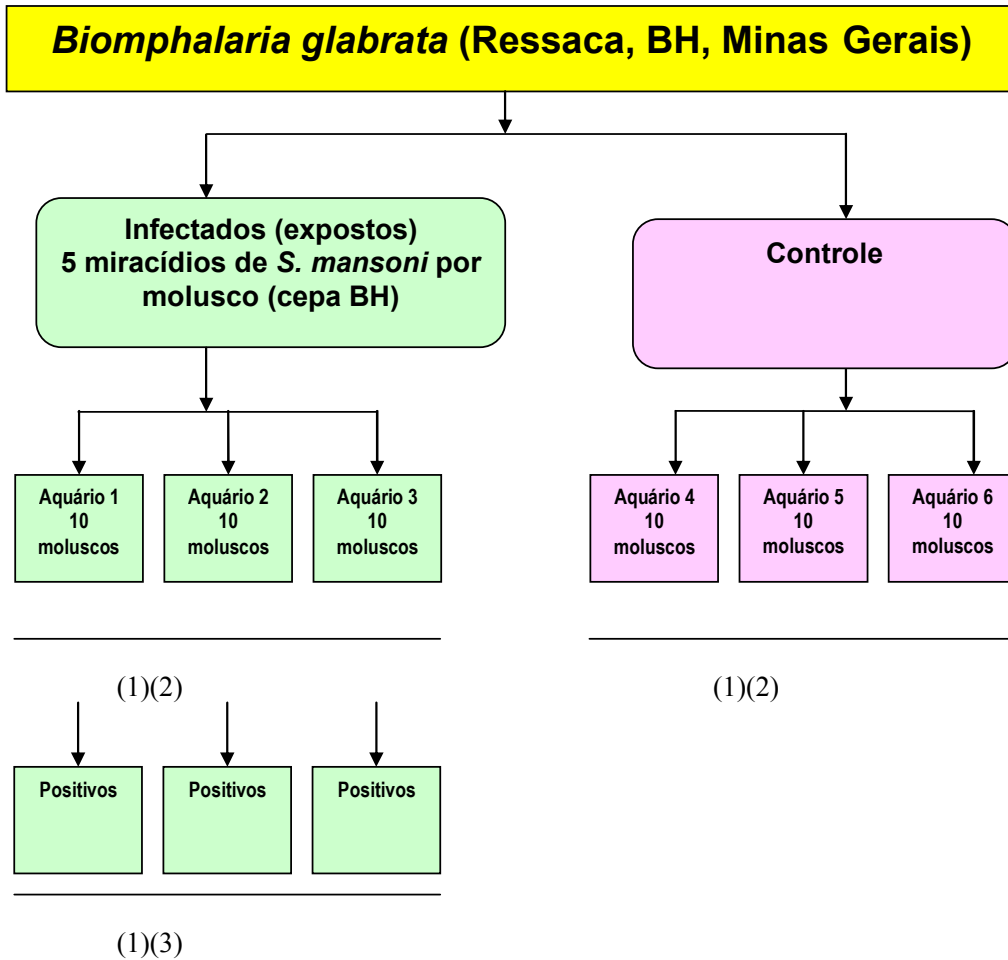
4.2 - Planejamento Experimental para a Biologia Reprodutiva de *Biomphalaria glabrata*

4.2.1 - Infecção Experimental

Foram utilizados 60 moluscos após atingirem a maturidade sexual com aproximadamente 72 dias e que apresentavam 8-10 mm de diâmetro de concha. Trinta espécimes foram expostos individualmente a cinco miracídios de *S. mansoni* e 30 permaneceram como controle não exposto. As infecções foram realizadas no Laboratório de Malacologia do IOC – FIOCRUZ/RJ, seguindo as normas de biossegurança estabelecidas pela Instituição na qual o laboratório enquadra-se na classe dois de Riscos Biológicos, com local e equipamento próprio para manipulação do material assim como para os descartes.

4.2.2 - Parâmetros Analisados

As observações da fecundidade (n° de massa ovígera por moluscos, n° de ovos por massa ovígera e n° ovos por molusco) assim como a fertilidade (taxa de eclosão dos moluscos) foram realizadas através de coletas semanais. Os moluscos, a partir do 30^o dia, foram expostos à luz individualmente para verificação da liberação de cercárias e os positivos foram mantidos em aquário separado. Semanalmente, a taxa de sobrevivência assim como a variação do crescimento foi mensurada através do desenvolvimento da concha. Essas observações foram realizadas até sessenta e dois dias a partir da exposição. (Figura 1.7)



(1) Fecundidade e fertilidade: N^o de massas ovíferas/molusco; N^o de ovos/massa ovígera; N^o de ovos/molusco; N^o de ovos eclodidos/massa ovígera; Taxa de sobrevivência; Taxa de crescimento. (2) Observações semanais durante 62 dias e (3) Observações no 30^o, 35^o, 40^o, 45^o, 50^o, 55^o e 62^o dia.

Figura 1.7 - Planejamento experimental usado para o estudo da biologia reprodutiva de *Biomphalaria glabrata*

4.3 - Planejamento Experimental para as Análises Bioquímicas

4.3.1 - Coleta da Hemolinfa, Massa Cefalopodal e Glândula Digestiva

Antes da dissecação, a concha foi perfurada na altura do coração com o auxílio de um bisturi com lâmina número 12. Então com uma seringa, com capacidade de 1ml foram coletadas alíquotas da hemolinfa dos moluscos diretamente da cavidade pericárdica. A hemolinfa assim coletada foi colocada em microtubos tubos de 1,5ml de capacidade e mantida no gelo para evitar a ação de enzimas sobre a glicose.

Após a coleta da hemolinfa o molusco teve sua concha quebrada com o auxílio de uma pinça de aço inox onde todos os fragmentos da concha eram removidos e as partes moles divididas em duas porções: 1) glândula digestiva 2) massa cefalopodal. Durante a dissecação, os frascos contendo as partes moles dos moluscos foram mantidos durante todo tempo de coleta em banho de gelo. Após pesagem em balança com precisão de 10/10.000g marca Bel, as partes dos moluscos foram armazenadas a -10°C até sua utilização.

4.3.2 – Determinação do conteúdo de glicose na hemolinfa

Foram utilizados 50 exemplares de *B.glabrata* infectados com 5 miracídios linhagem BH e 50 moluscos ficaram para o grupo controle seguindo uma cinética dos seguintes pontos de observação: 1, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 55, e 62 dias de infecção. Foi determinada a concentração de glicose na hemolinfa utilizando uma alíquota de 10µl. Para as dosagens foram utilizados os kits de diagnóstico laboratorial da marca Doles. As leituras foram feitas em um espectrofotômetro da marca Biospectro com comprimento de onda igual a 505nm. O aparelho foi zerado com água destilada, sendo utilizado como branco de reação um tubo onde a amostra foi substituída por água destilada. Uma solução de glicose a uma concentração de 10mg/dl, foi utilizada como padrão. A concentração de glicose na hemolinfa foi calculada através da Lei de Lambert-Beer e expressa em mg de glicose/dl (Pinheiro, 2003).

4.3.3 – Extração de Glicogênio da Glândula Digestiva e Massa Cefalopodal

A extração de glicogênio da glândula digestiva e massa cefalopodal seguiram a técnica descrita por Pinheiro e Gomes (1994).

Para avaliar a relação entre o parasitismo e a quantidade de glicogênio na glândula digestiva e massa cefalopodal de *B.glabrata*, foi realizado um estudo cinético utilizando dois grupos: 1) grupo exposto com 24 horas, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 55 e 62 dias de infecção (em cada ponto de observação foram utilizados 50 moluscos) 2) grupo controle (não infectado) também com 50 moluscos.

As concentrações de glicogênio foram determinadas através da reação do ácido 3,5 dinitro salicilato (DNS) e expressa em mg de glicose/g de tecido, peso fresco. As leituras foram feitas em espectrofotômetro Biospectro em 535 nm, utilizando com branco de reação um tubo de onde a amostra foi substituída por água destilada e uma solução padrão de glicose 1mg/ml, para a determinação do glicogênio. As concentrações de glicogênio também foram calculadas segundo a Lei de Lambert-Beer e expressas em mg glicose/g tecido/peso fresco.

4.4 - Histologia da Glândula Digestiva e Ovoteste de *Biomphalaria glabrata* Infectada com *S.mansoni*

Foram utilizados 50 moluscos medindo entre 8 e 10mm, com maturidade sexual para o grupo experimental e 50 moluscos de mesma medida não infectados para o grupo controle onde foram sacrificados ao mesmo tempo que os animais do grupo anterior.

4.4.1 - Infecção dos Moluscos

Esses moluscos foram colocados individualmente em placas com 24 poços e expostos a 20 miracídios da cepa BH, onde permaneceram durante 2 horas. Após esse período, esses moluscos foram colocados em aquários de vidro com 2L e mantidos em temperatura de $25 \pm 1^{\circ}$ C. Após 30, 35, 40, 45, 50, 55, 62 dias de infecção, os moluscos foram lavados em água corrente e colocados, individualmente, em tubos de plásticos pequenos de 50ml, com cerca de 4ml de água e exposto a um foco de luz (4 lâmpadas de 60W) durante 3 horas para verificar a positividade através da eliminação de cercárias. Decorrido este tempo de exposição, foi retirado 1ml de água e colocado em placas de plástico de 24 poços

onde foi acrescentada 1 gota de lugol 1% para fixação e coloração das cercárias. A contagem das cercárias foi realizada com auxílio de um microscópio estereoscópico e um contador manual de células.

4.4.2 - Procedimentos dos Moluscos

Os moluscos foram colocados em uma solução aquosa Nembutal 1% (anestésico), durante 4 horas. Depois do tempo estabelecido, retirou-se o excesso com papel toalha os moluscos foram colocados em uma placa vidro. Em seguida, os animais foram pressionados sobre a placa de vidro com uma lâmina de microscopia. A concha foi assim fragmentada e as partes moles foram removidas com uma pinça. Após a limpeza do material, as partes moles foram colocadas em Formol Millonig 10% onde permaneceram por 24 horas. Decorrido este tempo, o material foi desidratado em concentrações crescentes de etanol, diafianizados com xilol e impregnados em parafina líquida (60°C) segundo a metodologia descrita por Tolosa et al (2003). A inclusão foi realizada de tal maneira que se pudessem observar, nas lâminas histológicas, cortes longitudinais da estrutura corporal inteira do molusco. Posteriormente, os blocos foram submetidos a cortes seriados de 5µm de espessura em micrótomo Leica RM2125. O material foi corado pela hematoxilina-eosina (HE) para posterior análise histopatológica.

4.5 - Histoquímica da Glândula de Albúmen para Polissacarídeos

Por ser um órgão muito pequeno, não foi possível obter tecido com peso suficiente para a realização de dosagem do galactogênio da glândula de albúmen. Por esta razão, optou-se em fazer a análise histoquímica, fazendo-se o uso de colorações capazes de detectar a presença de polissacarídeos e possíveis alterações no transcurso da infecção. A metodologia adotada para preparação das lâminas foi a mesma descrita acima. Porém adotou-se a mesma cinética usada para a extração do glicogênio. As colorações utilizadas foram: (i) PAS (Periodic acid Schiff) para glicogênio e mucoproteínas; (ii) Alcian Blue pH 1.0 para glicoproteínas sulfatadas; (iii) Alcian Blue pH 2.5 para ácido hialurônico e glicoproteínas não sulfatadas; (iv) Tricromática de Masson para tecido conjuntivo, fibras colágenas e fibras musculares. Os procedimentos para as colorações descritas acima foram realizadas de acordo com Tolosa et al (2003). Os cortes histológicos foram

visualizados através do microscópio de luz Observer Z1 Zeiss e as imagens captadas por meio da câmera Axio Cam HRc Zeiss e processadas com o programa Axio Vision Rel.4.7.

4.6 - Análise Estatística

Os resultados obtidos nas observações da fecundidade, fertilidade e alterações fisiológicas (bioquímica) foram expressos pela média \pm desvio padrão e submetidos ao teste de análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey-Kramer para comparação das médias ($p < 0,05$). As médias totais dos resultados obtidos no período pré-patente e período patente foram comparadas pelo teste t para dados não pareados ($p < 0,05$). Programa estatístico utilizado foi o GraphPad software versão 1.0. A fecundidade e fertilidade dos moluscos expostos por *S.mansoni* nos períodos pré-patente e patente e o grupo controle foi comparada entre os grupos e dentro do mesmo grupo ao longo do experimento. As médias com diferenças estatisticamente significativas foram representadas por letras diferentes nas tabelas de acordo com Mello-Silva et al 2007.

5 - RESULTADOS

5.1 - Aspectos da Biologia Reprodutiva de *Biomphalaria glabrata*

5.1.1 - Sobrevivência

A população de *B. glabrata* infectada com a linhagem BH do *S. mansoni*, apresentou 50% de positividade e 100% de sobrevivência nos grupos controle, expostos e positivos. O período pré-patente foi de 39 dias após a exposição aos miracídios.

5.1.2 - Fecundidade

Foram observadas diferenças significativas na fertilidade e fecundidade dentro do mesmo grupo no período pré-patente nos moluscos expostos. (Tabelas 5.1 e 5.2).

No grupo exposto ao *S. mansoni*, o número de massas ovíferas por molusco foi significativamente menor aos sete dias de infecção quando comparados aos períodos de sete e 14 dias ($q= 5,4$; $p<0,05$) e sete e 28 dias ($q=5,4$; $p<0,05$) onde apresentaram diferenças significativas. Com relação ao número de ovos por molusco, os resultado obtidos aos sete dias de infecção em relação a maioria dos intervalos de tempo, com 10 e 17 dias. Para ovos por massa ovígera, apresentou diferença significativa entre os seguintes intervalos : sete e 14 dias ($q= 5,8$; $p< 0,05$); entre 10dias e o intervalo de 17-39 dias e entre 31 dias e o intervalo de 7-28 dias. Quando analisados separadamente, no período patente (40 a 62 dias) os moluscos expostos e que não eliminaram cercárias apresentaram um aumento nos parâmetros analisados, se comparados ao período pré-patente (7 a 39 dias), no entanto avaliados estatisticamente os resultados foram diferentes significativamente entre os grupos e em todo os intervalos de tempo (Tabela 5,1 e 5,2).

Tabela 5.1 - Fecundidade e fertilidade (média \pm desvio padrão) de *Biomphalaria glabrata* exposta (E) e não exposta (controle C) ao *Schistosoma mansoni* no período pré-patente até os 39 dias de infecção

Dias	Número de molusco		Massa ovígera/molusco		Ovos/molusco		Ovos/massa ovígera		Ovos eclodidos/massa ovígera	
	C	E	C	E	C	E	C	E	C	E
07	30	30	2,3 \pm 1,1 a	1,3 \pm 1,5 a	25,6 \pm 9,0 a	13,0 \pm 9,1 a	10,6 \pm 1,5 a	8,6 \pm 2,0 a	9,0 \pm 2,0 a	7,0 \pm 1,0 a
10	30	30	2,6 \pm 0,5 a	3,0 \pm 1,0 a,b	45,6 \pm 8,8 a,b,c	40,6 \pm 14,36 a,b	17,0 \pm 2,6 a,b	13,0 \pm 1,0 a,b	15,2 \pm 3,8 a,b	10,0 \pm 2,0 a,b
14	30	30	3,6 \pm 0,5 a	4,3 \pm 0,5 b	85,0 \pm 23,6 b	83,9 \pm 19,9 b,c	24,3 \pm 0,5 b,c	18,0 \pm 1,7 b,c	21,5 \pm 3,0 b,c,d	17,6 \pm 2,0 b,c
17	30	30	2,0 \pm 0,0 a	3,0 \pm 0,0 a,b	50,2 \pm 6,3 a,b	66,3 \pm 10,5 a,c	25,4 \pm 1,3 b,d,e	22,3 \pm 1,1 c,e	24,0 \pm 0,6 a,c	22,3 \pm 1,5 a,b,c
21	30	30	3,6 \pm 1,5 a	4,0 \pm 1,0 a,b	81,1 \pm 26,4 a, b,c	95,6 \pm 19,0 b, c	22,3 \pm 1,5 b,c,e	24,3 \pm 3,5 c,e	21,2 \pm 1,5 b,d	23,3 \pm 3,0 c
24	30	30	3,0 \pm 0,0 a	3,3 \pm 0,5 a,b	72,8 \pm 1,7 a,b,c	84,0 \pm 8,6 b,c	23,6 \pm 1,5 b,c,e	25,3 \pm 4,0 c,e	22,1 \pm 2,6 a,c,d	23,6 \pm 4,7 b,c
28	30	30	3,0 \pm 1,0 a	4,3 \pm 2,0 b	84,3 \pm 24,2 b,c	92,0 \pm 31,4 b,c	28,3 \pm 2,0 c,d,f	22,3 \pm 4,5 c,e	27,2 \pm 1,2 b, c,d	20,6 \pm 4,7 b,c
31	30	30	2,3 \pm 0,5 a	2,6 \pm 0,5 a,b	82,5 \pm 16,0 c	87,6 \pm 13,8 b,c	33,6 \pm 3,2 d,f	32,3 \pm 4,0 d	28,1 \pm 5,8 a,c,d	29,0 \pm 4,5 b,c
35	30	30	4,0 \pm 1,0 a	3,3 \pm 0,5 a, b	111,0 \pm 14,17 c	89,6 \pm 19,60 b,c	28,3 \pm 3,01 b,d,f	29,0 \pm 2,6 d,e	25,2 \pm 2,0 c,d	25,3 \pm 4,3 b,c
39	30	30	3,3 \pm 0,5 a	3,6 \pm 1,15 a,b	110,3 \pm 4,16 c	114,0 \pm 35,79 c	34,4 \pm 4,18 f	30,6 \pm 3,5 d,e	33,3 \pm 4,4 d	29,7 \pm 3,3 c

^{a,b,c,d,e} letras diferentes apresentam médias com diferenças significativas ($p < 0.05$). (E) moluscos expostos sem eliminação de cercárias.

Tabela 5.2 - Fecundidade e fertilidade (média \pm desvio padrão) de *Biomphalaria glabrata* exposta (E) e não exposta (controle C) ao *Schistosoma mansoni* no período patente até os 62 dias de infecção

Dias	Número de moluscos		Massa ovígera/molusco		Ovos/molusco		Ovos/massa ovígera		Ovos ecoldidos/massa ovígera	
	C	E	C	E	C	E	C	E	C	E
42	30	25	3,6 \pm 0,1	3,6 \pm 0,57	111,0 \pm 6,08	113,6 \pm 36,19	32,8 \pm 3,25	30,6 \pm 5,8	32,7 \pm 3,0	29,7 \pm 3,3
45	30	18	4,0 \pm 0,0	5,6 \pm 2,08	147,3 \pm 45,61	180,3 \pm 65,43	35,6 \pm 9,41	32,6 \pm 1,1	34,6 \pm 48,4	29,0 \pm 5,6
49	30	18	4,0 \pm 0,0	7,0 \pm 3,60	141,0 \pm 1,73	219,6 \pm 99,63	32,7 \pm 0,26	33,3 \pm 2,5	3,9 \pm 0,6	30,2 \pm 0,6
51	30	18	4,0 \pm 0,0	6,6 \pm 3,05	146,0 \pm 32,35	173,3 \pm 67,35	34,4 \pm 7,31	28,6 \pm 7,2	33,9 \pm 7,3	27,8 \pm 8,1
55	30	18	4,3 \pm 0,5	5,3 \pm 3,21	105,6 \pm 15,82	141,6 \pm 32,34	24,3 \pm 2,08	31,3 \pm 9,8	22,6 \pm 66,58	30,0 \pm 9,4
58	30	15	3,3 \pm 0,5	8,0 \pm 4,35	102,3 \pm 5,77	203,0 \pm 132,92	30,3 \pm 2,85	25,3 \pm 3,2	25,8 \pm 2,9	24,2 \pm 2,8
62	30	15	3,3 \pm 0,5	8,6 \pm 5,50	96,0 \pm 10,14	222,3 \pm 123,57	28,8 \pm 0,85	25,6 \pm 2,0	27,8 \pm 2,4	24,4 \pm 1,8
Média	-	-	4,2 \pm 0,4	6,4 \pm 3,0	1.33,8 \pm 17,0	182,1 \pm 76,5	35,2 \pm 4,1	33,3 \pm 4,7	33,4 \pm 17,1	31,2 \pm 4,9

Todas as médias apresentaram diferenças não significativas ($p > 0,05$). (E) moluscos expostos sem eliminar cercárias.

A Tabela 5.3 mostra os resultados dos moluscos positivos em função dos dias de infecção. Os moluscos positivos cessaram a oviposição aos 45 dias de infecção (Tabela 5.4). No 50º dia de infecção, entre os moluscos positivos que realizaram posturas, foi observado o número médio de 0,9 massa ovígera por molusco e 5,3 ovos por massa ovígera, ovos por molusco 4,6. Entretanto, os ovos presentes eram inviáveis. (Tabela 5.4)

5.1.3 - Fertilidade

No período pré-patente observou-se diferença significativa para os ovos por massa ovígera nos intervalos de sete a 14 ($q=7,0$; $p<0.01$) e sete e os demais dias de infecção com exceção do 10º e 17º dia. Quanto ao período patente os parâmetros não apresentaram diferenças significativas. Comportamento semelhante se observou em relação a ovos por molusco mostrando que houve uma sincronia em relação a oviposição e eclodibilidade (Tabelas 5.1 e 5.2).

Quando comparados os grupos controle e expostos estes não apresentaram diferenças significativas, tanto para fecundidade e fertilidade nos intervalos analisados (7-62 dias) estes não apresentaram diferenças significativas.

5.1.4 - Crescimento

A média de diâmetro de concha, variou de 10,6 mm a 17,0 mm para o controle, um aumento de 6,4 mm de concha, e de 10,6 a 17,7 mm para os expostos, (um aumento de 7,1 mm). A partir do 40º dia, o diâmetro da concha dos moluscos positivos variou de 15,0 a 18,0 mm, (um aumento de 3,0 mm) enquanto que no grupo controle houve uma variação de 15,2 a 17,0 mm (um aumento de 1,8 mm). Os moluscos positivos mantiveram um ritmo contínuo de crescimento até 62º dia que corresponde ao período de oviposição. (Figura 5.1)

Tabela 5.3 – Infecção de *Biomphalaria glabrata* por *S.mansoni* (positivo) no período patente.

Observação (Dia)	Número total de moluscos	Número de moluscos positivos
40	30	5
45	25	7
50	18	0
55	15	0
62	15	3
TOTAL		15

Tabela 5.4 - Fecundidade e fertilidade de *Biomphalaria glabrata* infectada com *S.mansoni* (exposto positivo) no período patente da infecção

Número de moluscos positivos	Observação (dia)	Número total de massa ovígera	Número total de ovos	Número médio de massa ovígera/molusco	Número médio de ovos/molusco	Número médio de ovos/massa ovígera	Número de ovos eclodidos	Número médio de ovos eclodidos/massa ovígera
5	40	0	0	0	0	0	0	0
	45	0	0	0	0	0	0	0
	50	0	0	0	0	0	0	0
	55	0	0	0	0	0	0	0
	60	0	0	0	0	0	0	0
7	45	0	0	0	0	0	0	0
	50	6	32	0,9	4,6	5,3	0	0
	55	0	0	0	0	0	0	0
	60	0	0	0	0	0	0	0
3	55	0	0	0	0	0	0	0
	60	0	0	0	0	0	0	0

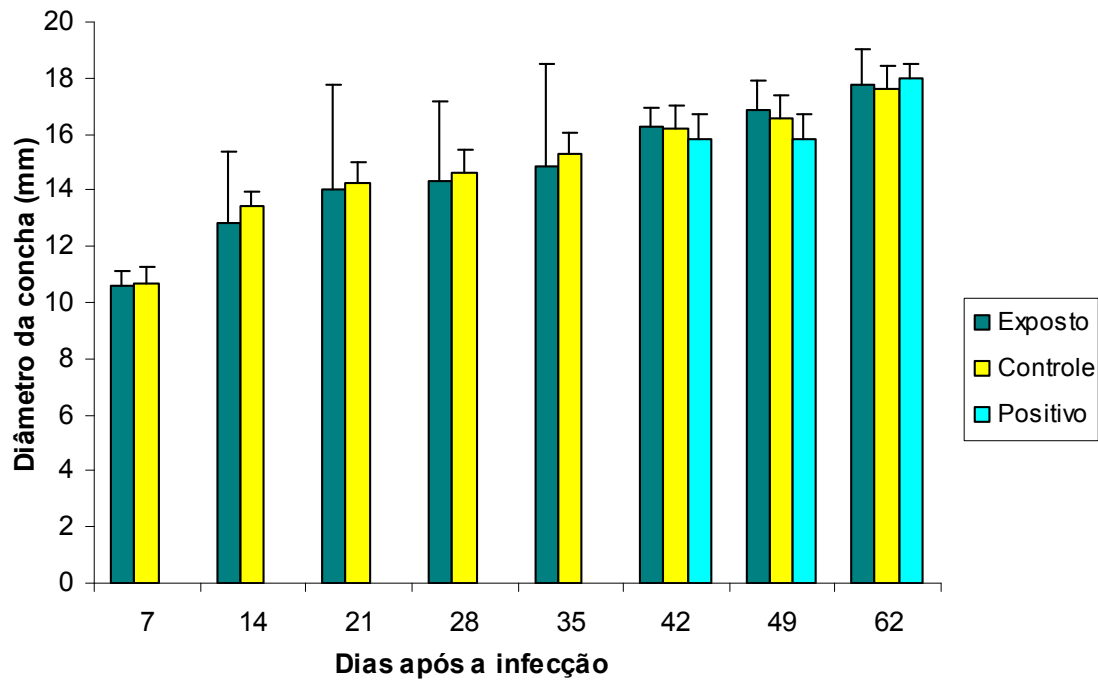


Figura 5.1 – Média e desvio padrão do crescimento semanal da concha (mm) de *Biomphalaria glabrata* após exposição ao *Schistosoma mansoni*: expostos (moluscos que não eliminaram cercárias)■; controle (moluscos não infectados)■ e positivos (moluscos que eliminaram cercárias)■.

5.2 - Alterações Fisiológicas em *Biomphalaria glabrata* Infectada com *Schistosoma mansoni*

5.2.1 - Determinação do Conteúdo de Glicose na Hemolinfa

O conteúdo de glicose na hemolinfa de *B. glabrata* infectada com *S. mansoni* variou de 5,3 mg/dl a 70,0mg/dl, onde foi possível observar oscilações entre os 21º e 35º dias. No período entre 49 e 62 dias pode-se verificar um aumento no conteúdo de glicose na hemolinfa, sendo diferente significativamente dos demais períodos estudados (Tabela 5.5).

5.2.2 - Extração e Dosagem de Glicogênio da Massa Cefalopodal e da Glândula Digestiva de *Biomphalaria glabrata* Infectada com *Schistosoma mansoni*

Na massa cefalopodal com 24 horas de infecção foi observado um aumento do conteúdo de glicogênio em relação aos outros períodos estudados. Na faixa de 21º a 35º dias não houve diferença significativa no conteúdo de glicogênio em relação ao controle (Tabela 5.5), no entanto, no período de 42 a 62 dias verificou-se oscilações na dosagem do glicogênio, observando diferença significativa aos 42 dias e 55 dias.

Na glândula digestiva observou-se diferença significativa em todos os valores relacionados a dosagem de glicogênio nos moluscos infectados comparados com o controle.

5.3 – Histopatologia da Glândula Digestiva e do Ooteste de *Biomphalaria glabrata* Infectada com *Schistosoma mansoni*

Foram feitas as secções nos moluscos com 45 e 55 dias de infecção, que estavam eliminando cercárias. As análises feitas através da microscopia de luz revelaram que *B. glabrata* com 45 dias de infecção na região do ooteste, apresenta um acúmulo de parasitos no seu interior. Porém, uma porção do órgão ainda está parcialmente preservada, onde se nota a presença de espermatozoides e revestimento de células germinativas primitivas (Figura 5.2 e 5.3). Aos 55 dias, o ooteste apresenta atrofia considerável com o desaparecimento quase que total das células germinativas e o estroma de sustentação formando uma rede quase vazia (Figura 5.4a). Na Figura 5.4b pode ser visto o estroma de sustentação praticamente vazio.

Tabela 5.5 – Média e desvio padrão da concentração de glicose (mg/dl) na hemolinfa e da concentração de glicogênio (mg de glicose/g de tecido peso fresco) na glândula digestiva e na massa cefalopodal de *Biomphalaria glabrata* infectada e não infectada por *Schistosoma mansoni*.

Tempo de infecção (dias)	Concentração de glicose na hemolinfa (mg/dl)	Concentração de glicogênio (mg de glicose/g de tecido)	
		Massa cefalopodal	Glândula digestiva
(controle)	16,3± 2,8 a,c,d	5,0 ± 1,0 a,d	39,0 ± 15,8 a
1	15,6± 2,3 a,d	17,0 ± 4,3 b	12,0 ± 1,0 b
7	11,6± 1,1 a,d	8,0 ± 1,0 a,c	8,6 ± 0,5 b
14	10,0± 2,0 a,d	6,0 ± 0,0 a,c,d	5,3 ± 0,5 b
21	19,0±2,6 d	4,0 ± 0,0 a,d	5,0 ± 0,0 b
28	5,6± 0,5 a	4,0 ± 1,0 a,d	14,4 ± 1,1 b
35	5,3± 1,1 a	5,0 ± 1,0 a,d	5,9 ± 0,1 b
42	29,3±5,8 c	9,6 ± 1,1 c,e	6,1 ± 0,1 b
49	70,0± 9,1 b	5,0 ± 1,0 a,d	9,4 ± 1,3 b
55	59,3±7,5 b	2,6 ± 0,5 d,e	4,4 ± 1,0 b
62	69,6±4,5 b	5,3 ± 0,5 a,e	3,6 ± 1,0 b

^{a,b,c,d,e} letras diferentes apresentam médias com diferenças significativas (p<0,05).

No ovoteste normal, pode-se observar na parede dos ácinos a presença de um tecido conectivo fino com espermatozóides e óvulos e revestimento de células germinativas (Figura 5.5). Aos 45 dias de infecção à glândula digestiva, mostrou um foco de multiplicação parasitária com esporocistos e cercárias, com o tecido da glândula um pouco preservada (Figura 5.6), diferente do aspecto da glândula digestiva normal onde se observa um epitélio cilíndrico simples alto, do tipo mucoso com núcleos em posição basal e com ductos hepáticos (Figura 5.7).

5.4 - Histoquímica da Glândula de Albúmen de *Biomphalaria glabrata* Infectada com *S.mansoni*

O conteúdo dos grânulos de secreção da glândula de albúmen apresentou coloração pelo Alcian Blue (AB) pH 1,0 e 2,5 nos animais infectados, indicando a presença de carboidratos sulfatados e carboxilados. (Figuras 5.8, 5.9, 5.10 e 5.11) Nestas colorações, assim como na coloração pelo HE, a individualidade dos grânulos pôde ser visualizada, assim como o caráter basófilo e eosinofílico do conteúdo granular (Figura 5.12). Este último aspecto também foi evidenciado na coloração de Tricromo de Masson (Figura 5.13). O conteúdo dos ductos cora-se pelo PAS e pelo Tricromo Masson nos animais infectados, evidenciando a natureza polissacarídica do material secretado, no caso para o Tricromo Manson com grânulos bem preservado. (Figuras 5.14 e 5.13).

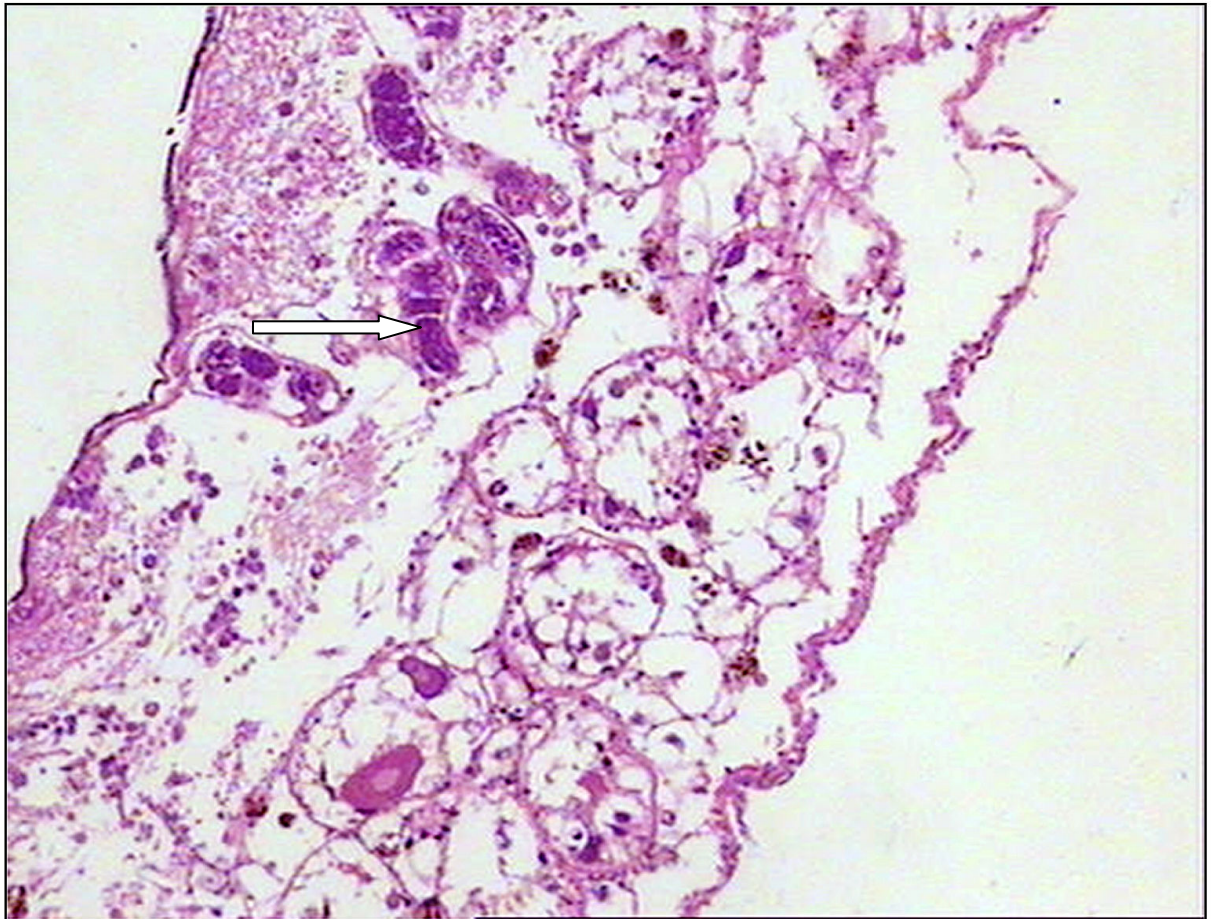


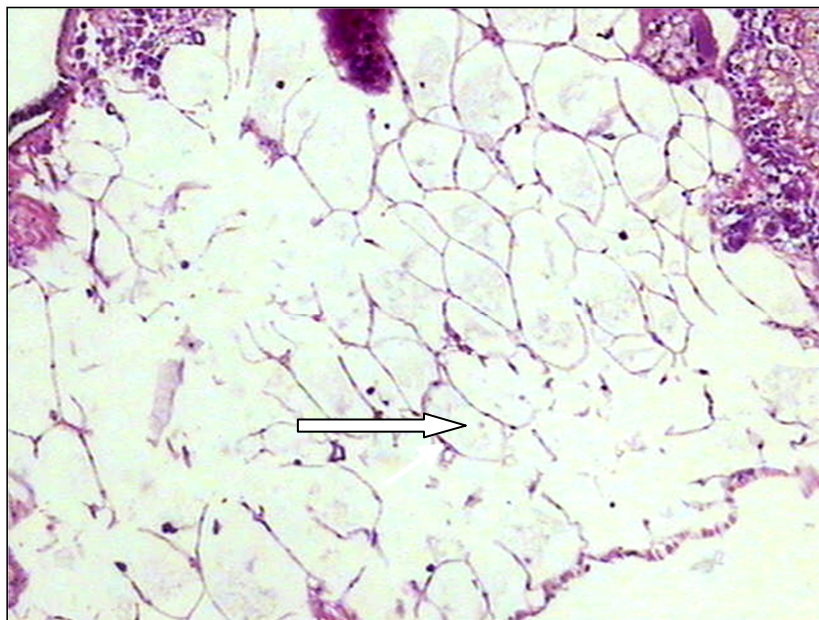
Figura 5.2 – *Biomphalaria glabrata* infectada por *Schistosoma mansoni*. Região do ovoteste com alguns esporocistos (seta) em diferentes fases de desenvolvimento com 45 dias de infecção, HE, 20X



Figura 5.3 – *Biomphalaria glabrata* infectada com *Schistosoma mansoni*. Zona de acúmulo parasitário no interior do ovoteste a qual mostra também uma porção do órgão ainda parcialmente preservada (seta branca). Notam-se espermatozoides e revestimento de células germinativas primitivas (45 dias de infecção)(seta preta), HE 20X.



(a)



(b)

Figura 5.4 – *Biomphalaria glabrata* infectada com *Schistosoma mansoni* aos 55 dias de infecção. (a) Na região do ovoteste observa-se considerável atrofia, com desaparecimento quase total de células germinativas. Observa-se também o estroma de sustentação como uma rede quase vazia (seta), HE 10X (b) Detalhe do ovoteste da Figura 5.4 (a)(seta), HE, 40X.

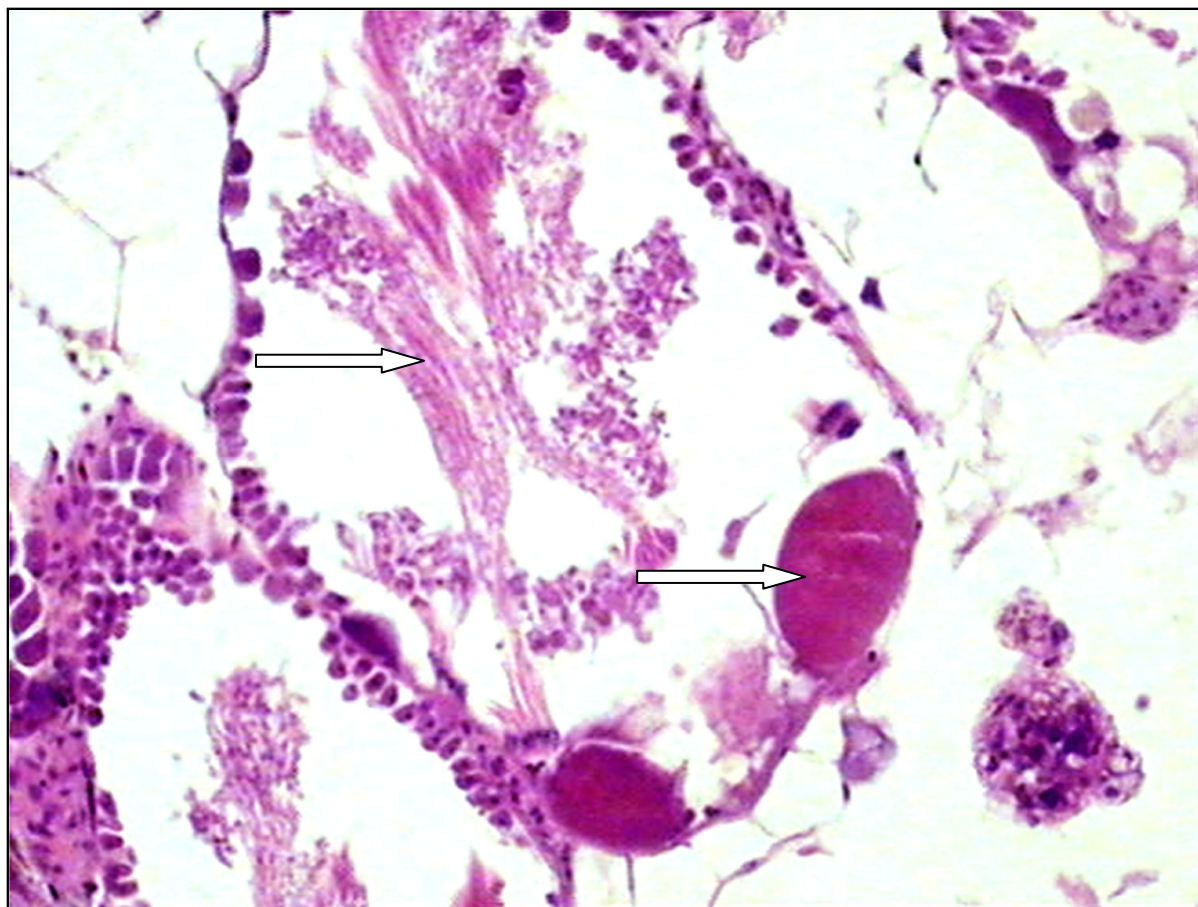


Figura 5.5 – *Biomphalaria glabrata* sem infecção. Ovoteste normal. Observam-se espermatozoides, óvulos e revestimento de células germinativas (setas), HE, 40X.

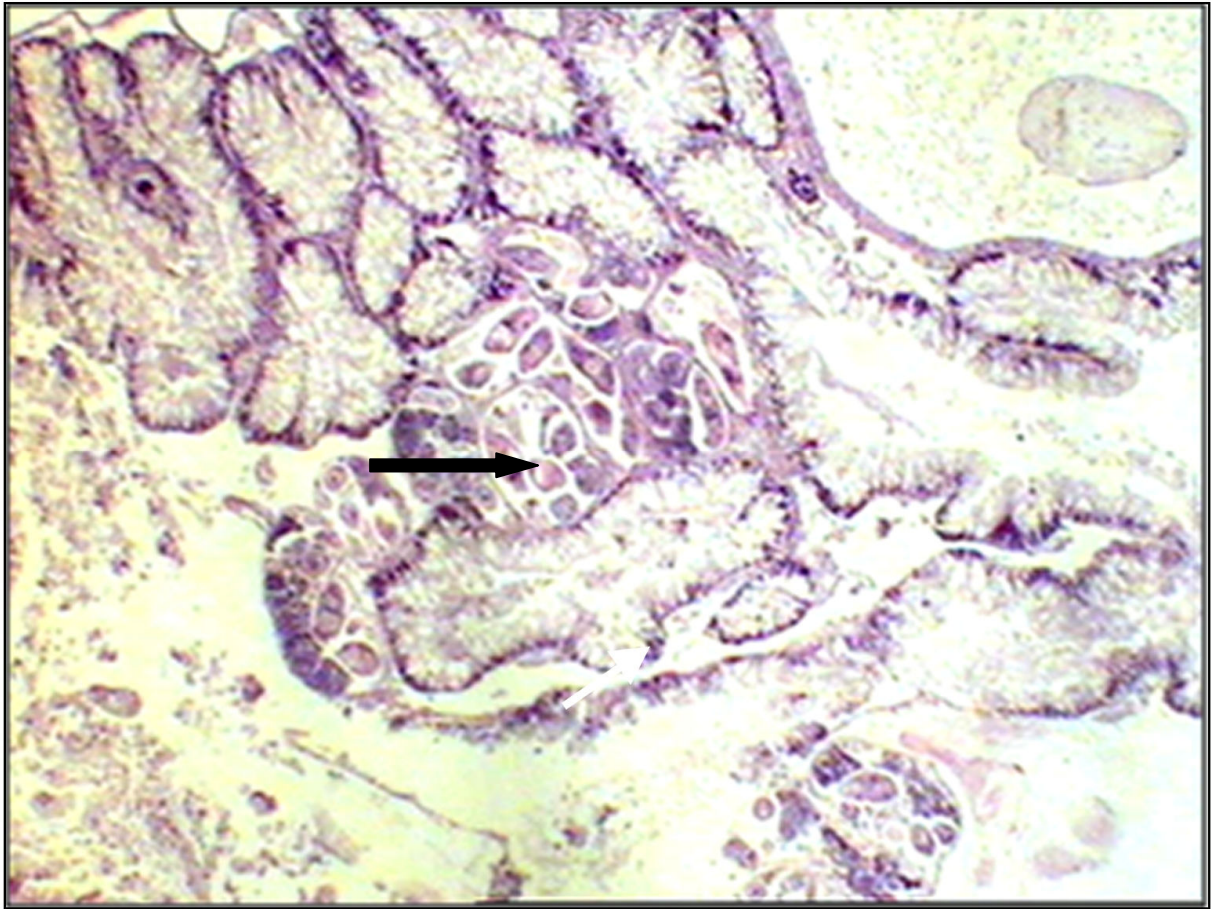


Figura 5.6 – *Biomphalaria glabrata* infectada com *Schistosoma mansoni*. Foco de multiplicação parasitária entre as glândulas digestiva um pouco preservada (seta), com 45 dias de infecção, HE, 20X.

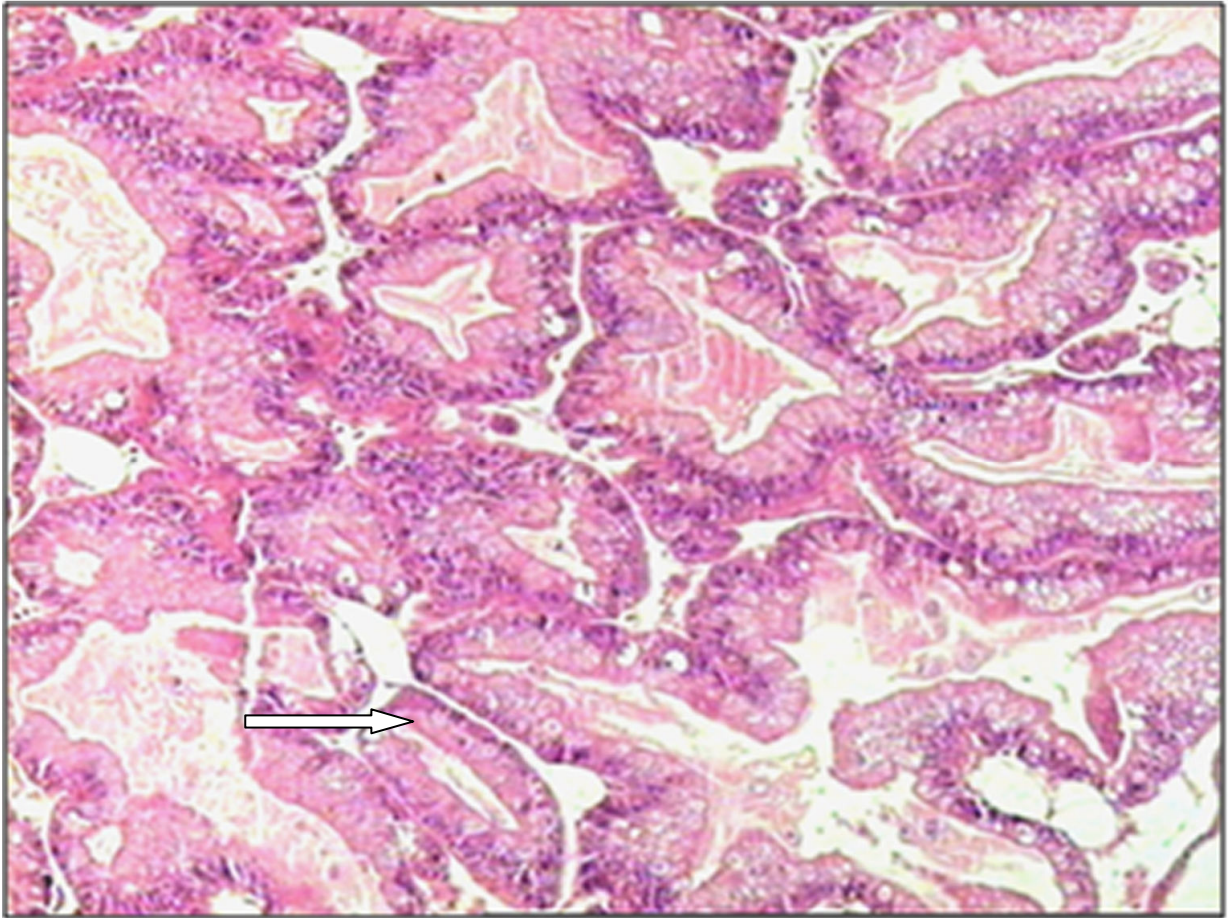


Figura 5.7 – *Biomphalaria glabrata* sem infecção. Glândula digestiva de aspecto normal, observando-se epitélio cilíndrico alto de tipo mucoso, com núcleos em posição basal (seta), HE, 20X.

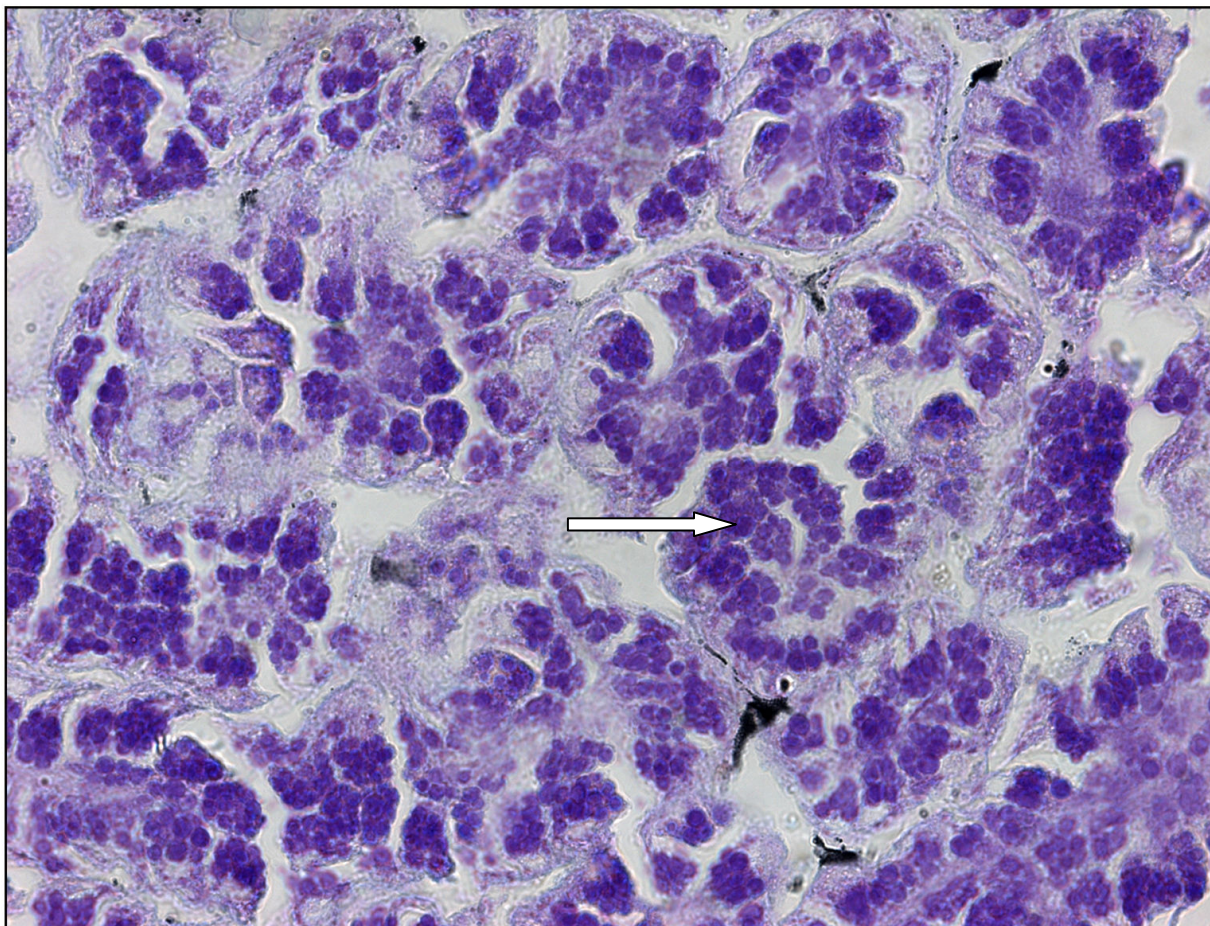


Figura 5.8 – *Biomphalaria glabrata* infectada por *Schistosoma mansoni* com sete dias de infecção. Glândula de albúmen com grânulos de secreção (seta). Alcian blue, pH 1.0, 63X.

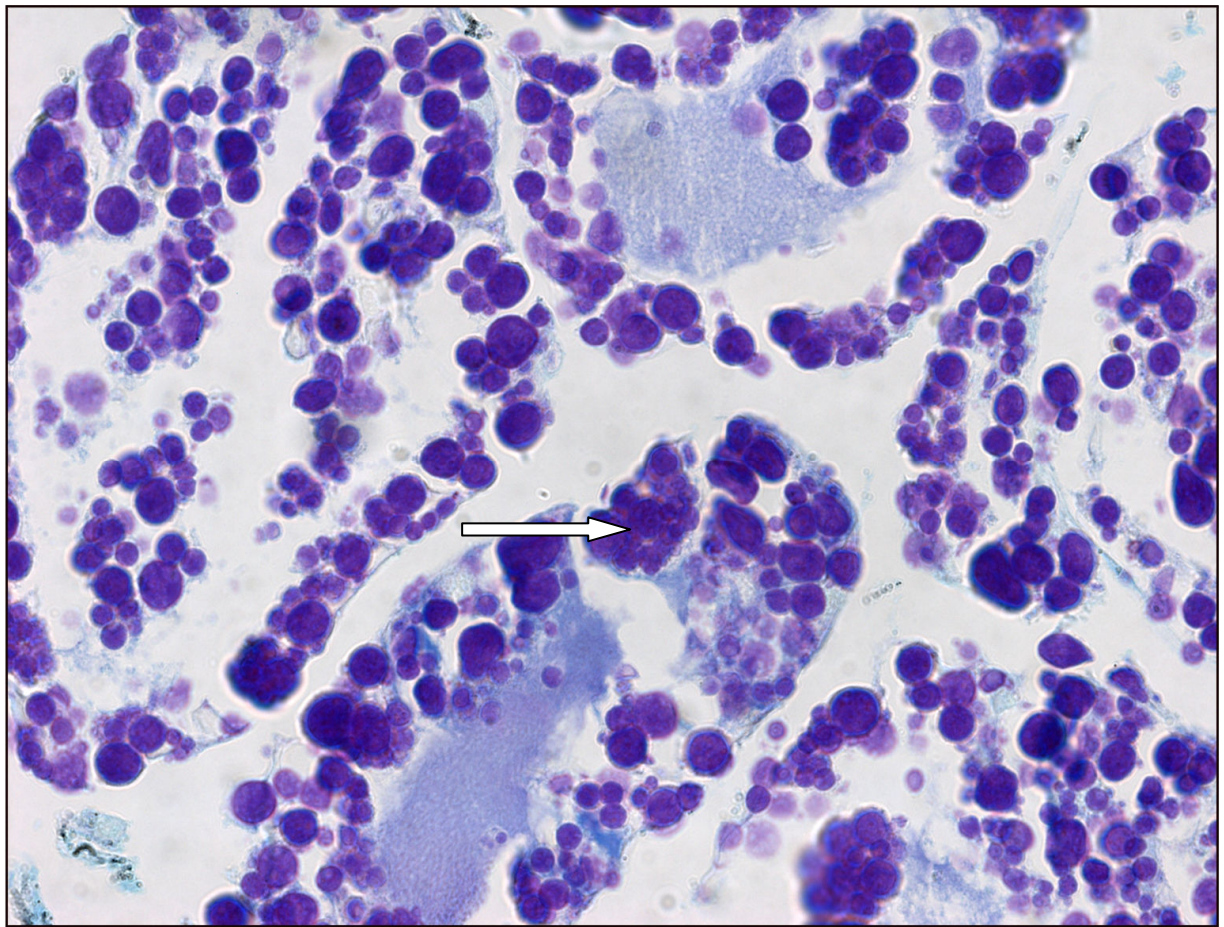


Figura 5.9 – *Biomphalaria glabrata* infectada por *Schistosoma mansoni* aos 35 dias de infecção. Glândula de albúmen com menor número de grânulos (seta) presentes nas células acinares. Alcian blue, pH 1,0, 63X.

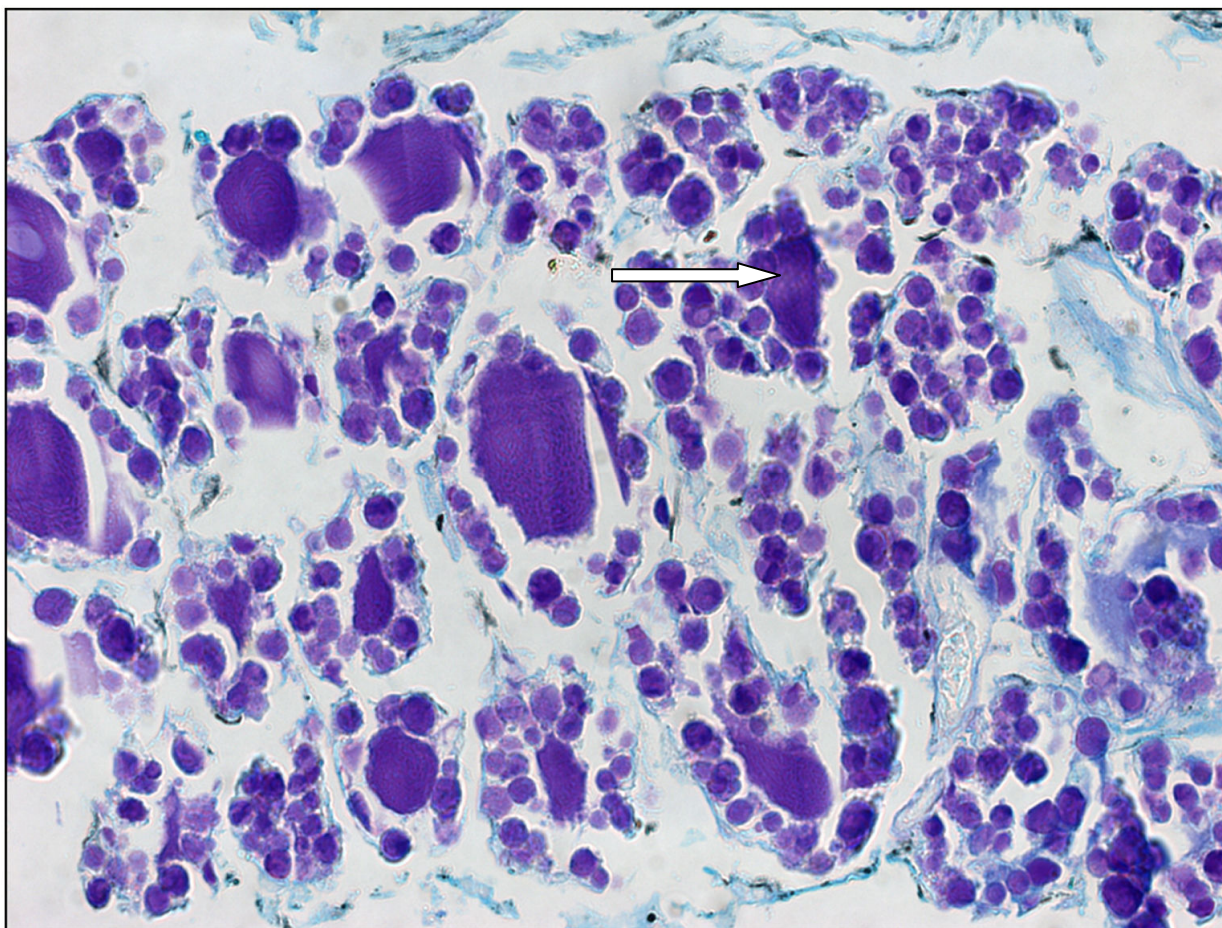


Figura 5.10 – *Biomphalaria glabrata* infectada por *Schistosoma mansoni* com 42 dias de infecção. Glândula de albúmen com diminuição dos grânulos de secreção (seta). Alcian blue, pH 1.0, 40X.

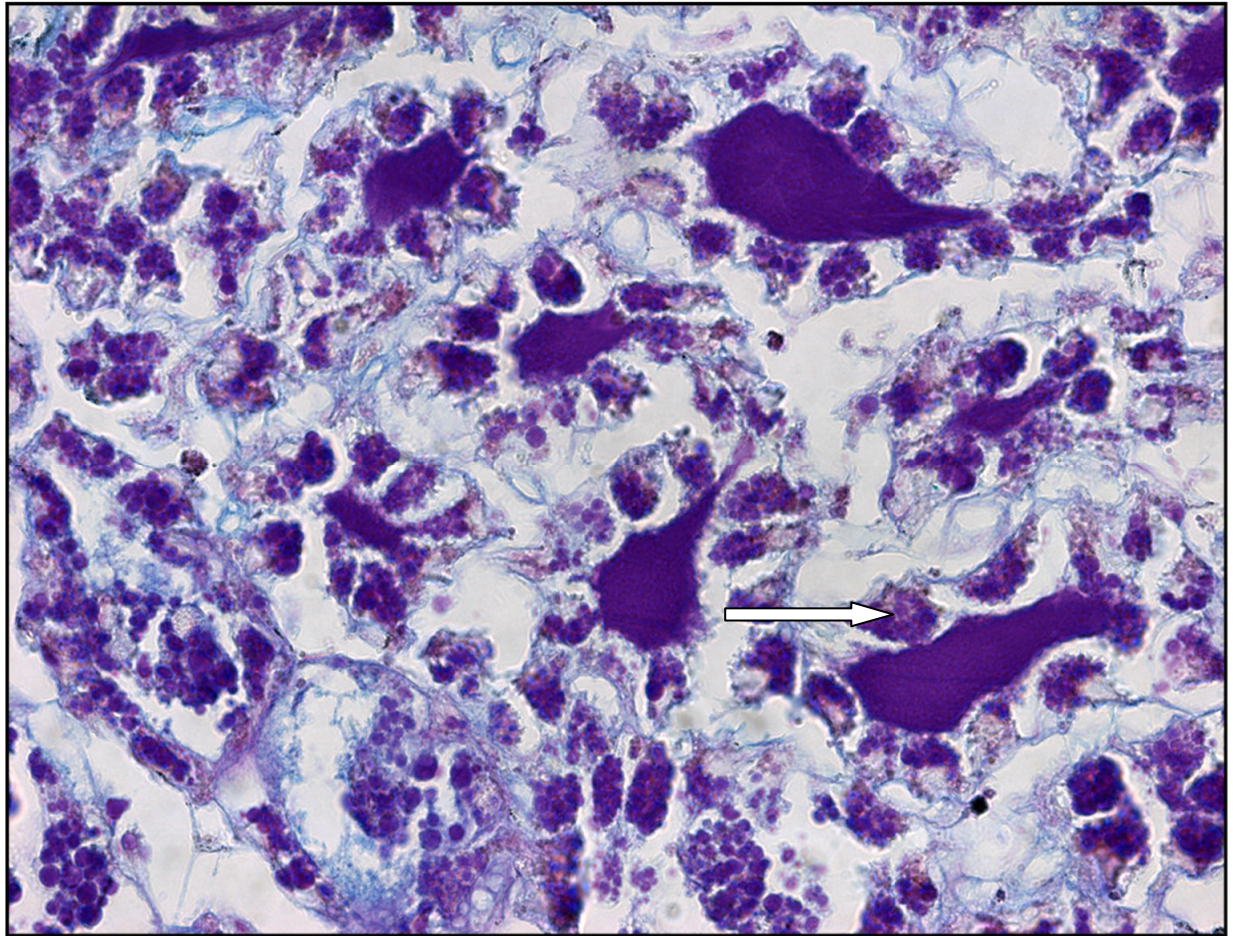


Figura 5.11 – *Biomphalaria glabrata* infectada por *Schistosoma mansoni* com 55 dias de infecção. Glândula de albúmen com intensa diminuição dos grânulos de secreção (seta). Alcian blue, pH 2,5, 63X.

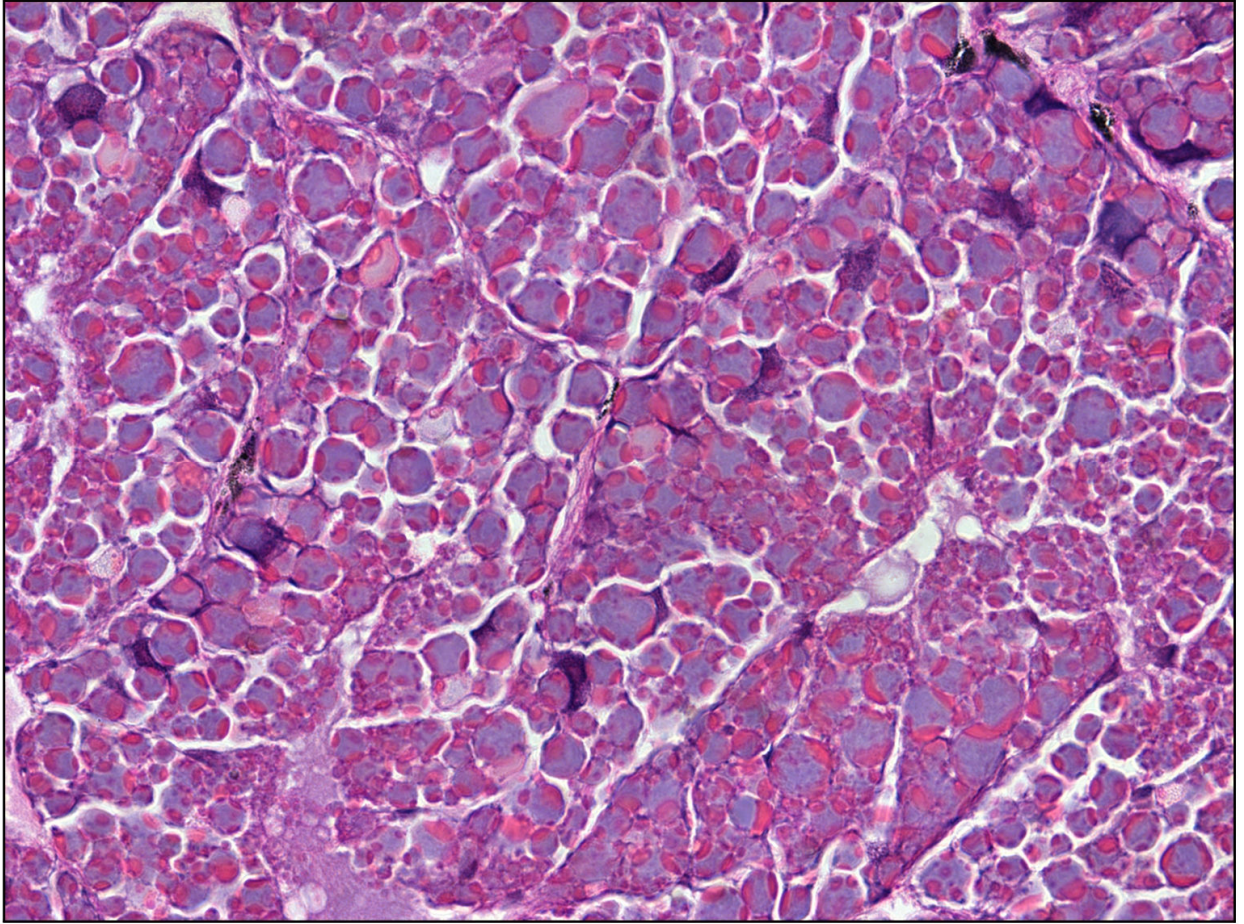


Figura 5.12 – *Biomphalaria glabrata* sem infecção. Glândula de albúmen de *Biomphalaria glabrata* normal, HE, 63X.

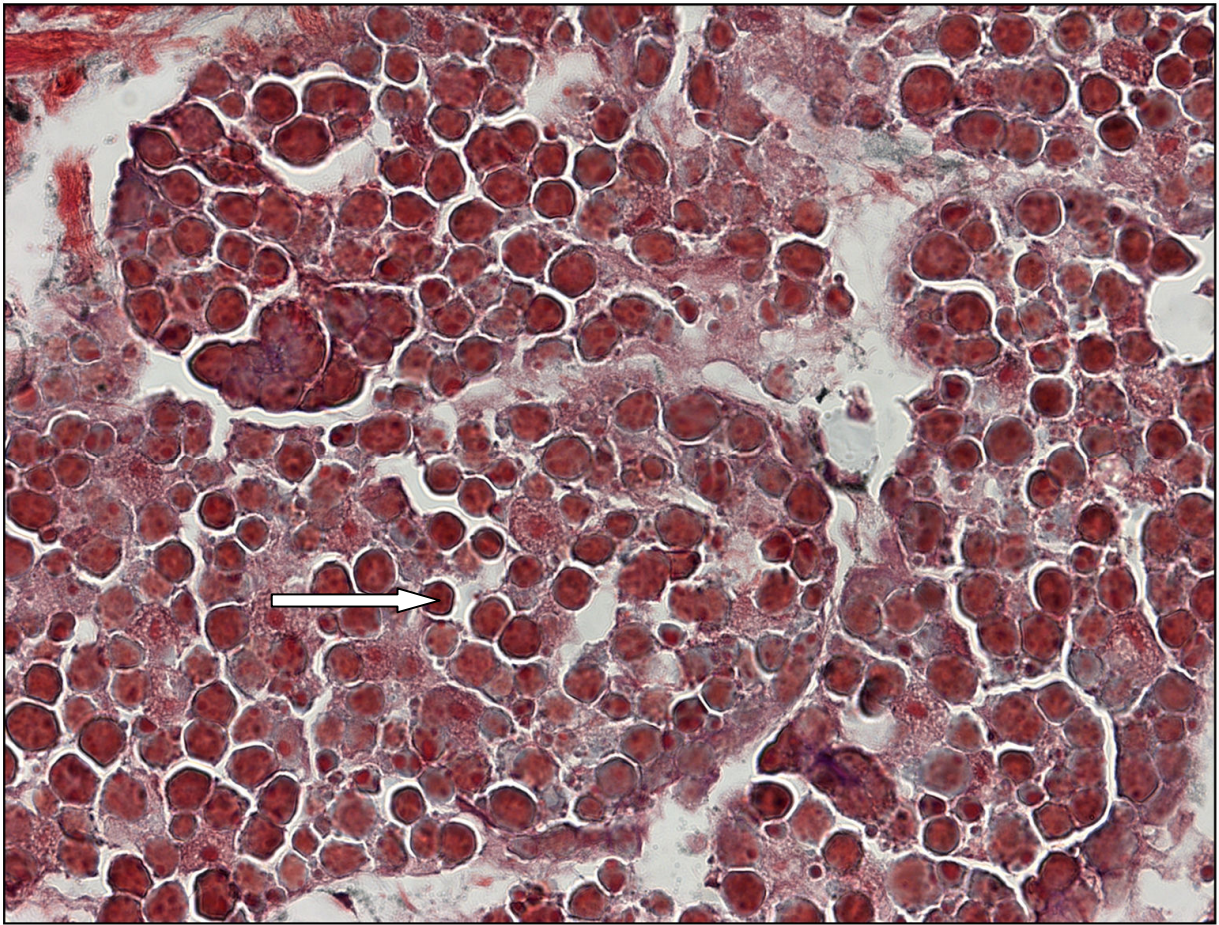


Figura 5.13 – *Biomphalaria glabrata* infectada por *Schistosoma mansoni* com 14 dias de infecção. Glândula de albúmen grânulos de secreção preservados (seta). Tricromo Masson, 63X.

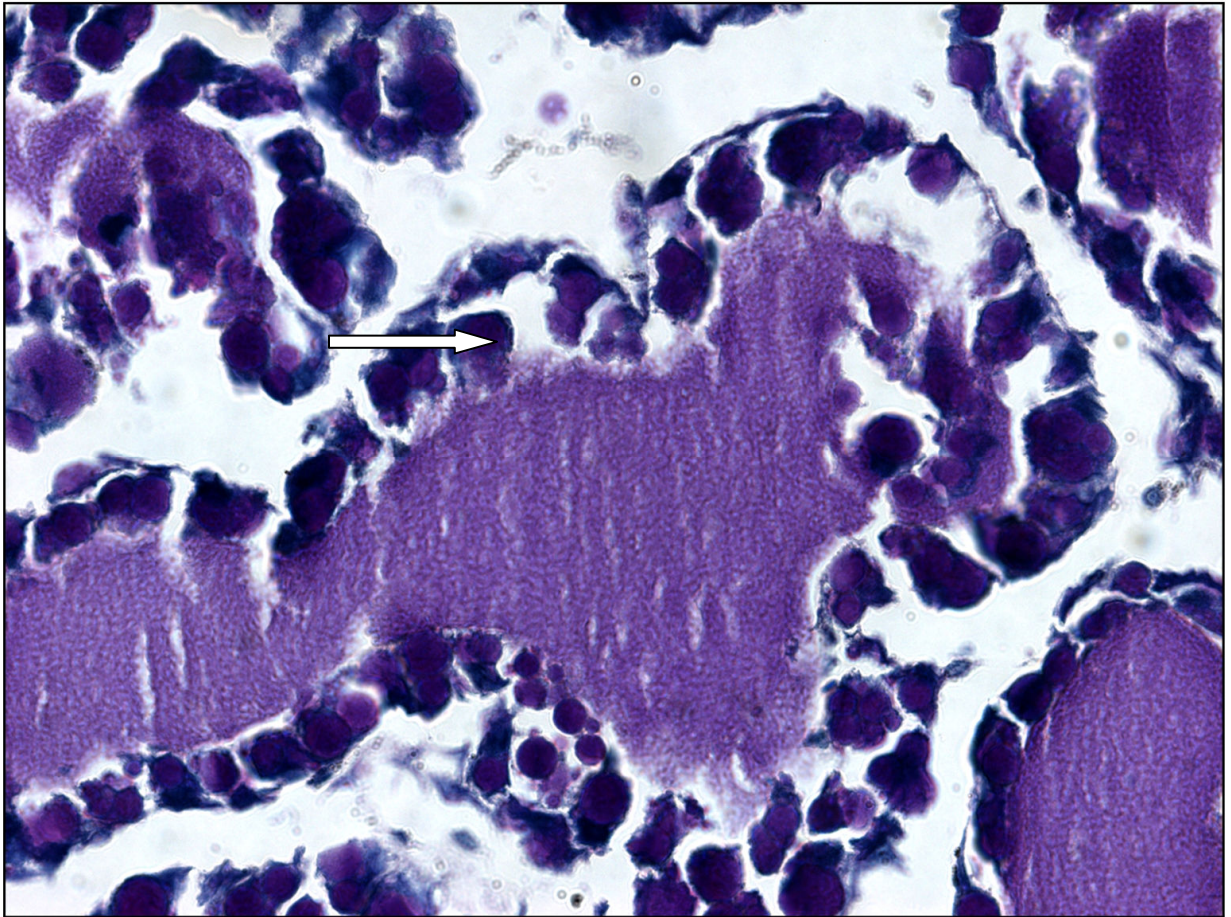


Figura 5.14 – *Biomphalaria glabrata* infectada por *Schistosoma mansoni* com 35 dias de infecção. Detalhe da secreção ductal (seta) com 35 dias de infecção, PAS, 63X.

A partir de 35 dias de infecção foi possível observar pequenas alterações histológicas, como uma discreta e gradual diminuição do número e do tamanho dos grânulos de secreção e do conteúdo do lúmen ductal (Figura 5.9).

Aos 42 dias de infecção, os esporocistos secundários passaram ser evidenciados na glândula de albúmen (Figura 5.15) havendo um notável aumento do número de parasitos após os 49 dias de infecção. Este evento foi acompanhado por reação hemocitária restrita a áreas em torno dos esporocistos (Figura 5.16), havendo regiões da glândula histologicamente preservadas.

6 - DISCUSSÃO

6.1 Aspectos da Biologia Reprodutiva

6.1.1 - Mortalidade

A ausência de mortalidade em moluscos infectados está associada a condição de simpatria da população de moluscos e da linhagem do parasito (Hurd, 2001). Entretanto, Fernandez e Pieri (2001) verificaram que a relação *B. glabrata* - *S. mansoni* também pode se apresentar mais ajustada mesmo entre espécies alopátricas apresentando baixa mortalidade. Em nosso estudo verificamos que não ocorreu mortalidade entre os moluscos submetidos a infecção mesmo os que desenvolveram infecção patente, indicando a existência de elevada compatibilidade entre ambos. O número de miracídios a que um molusco é exposto invariavelmente está associado à alta taxa de mortalidade, podendo ocorrer mesmo quando um pequeno número de larvas é utilizado (Fernandez; Pieri, 2001). Neste estudo, o efeito da densidade populacional favoreceu a falta de mortalidade, já que embora os moluscos estivessem infectados, não estavam vivendo em populações densas isso pode ter influenciado na sobrevivência (Coelho et al, 2008).

6.1.2 - Crescimento

De acordo com Perlowagora-Szumlewicz (1968) e Sturrock e Sturrock (1970), o crescimento dos moluscos está diretamente relacionado à atividade reprodutiva, sendo influenciado pela disponibilidade de recursos. Estes autores observaram que moluscos infectados com idade e tamanho semelhantes diminuíram o seu crescimento após quatro semanas de infecção, culminando com o início do período patente. Por outro lado, Thornhill et al (1986) relataram que os caramujos expostos cresceram mais do que o grupo controle. Este processo tem sido relacionado com o

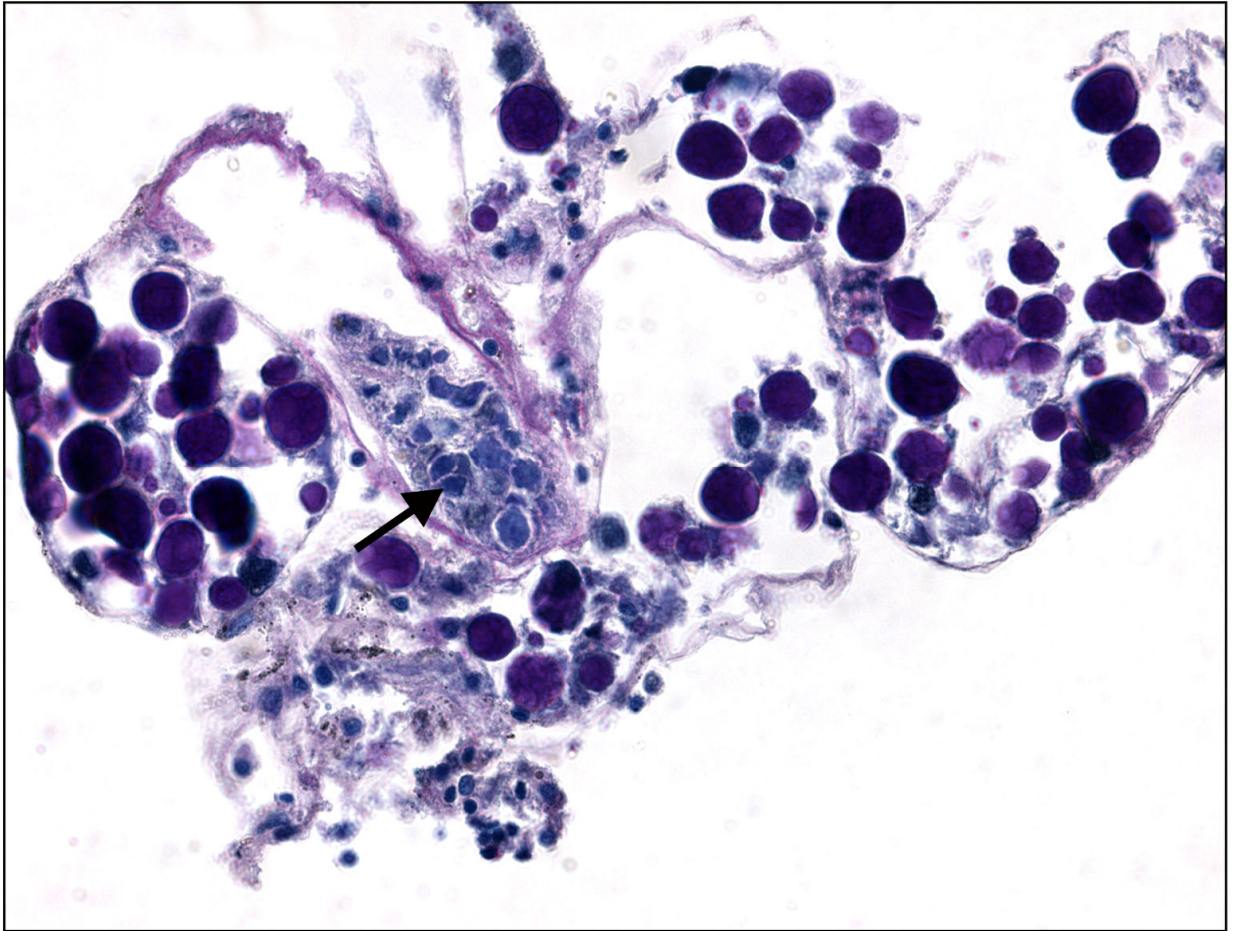


Figura 5.15 – *Biomphalaria glabrata* infectada pelo *Schistosoma mansoni* aos 42 de infecção. Presença de esporocisto no interior da glândula de albúmen (seta), PAS, 63X.

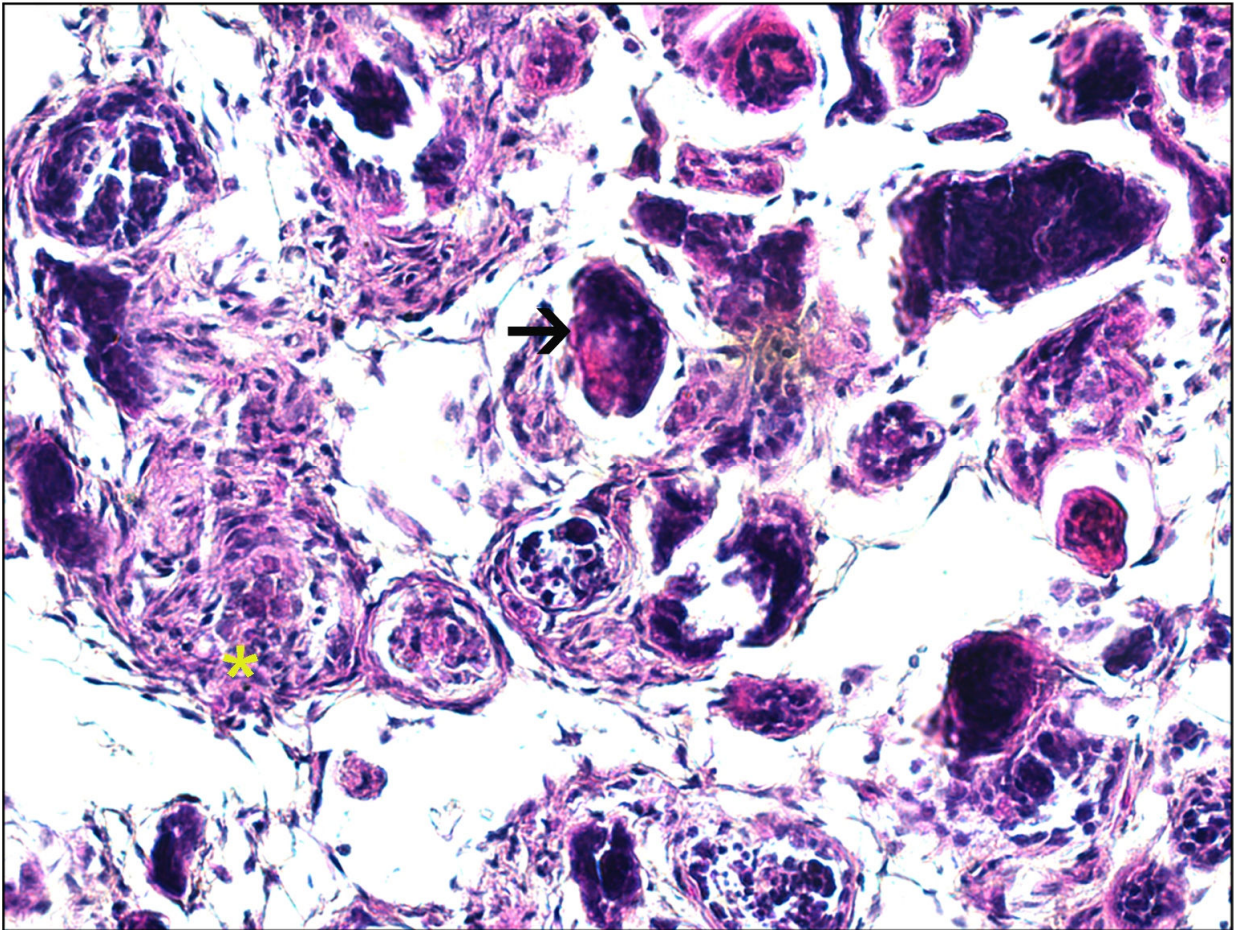


Figura 5.16 – *Biomphalaria glabrata* infectada pelo *Schistosoma mansoni* com 49 dias de infecção. Região da glândula de albúmen com vários esporocistos presentes (seta) e uma redução do número de ácinos, onde se observa reação hemocitária (asterisco),HE,40X.

gigantismo, fato ainda, não bem compreendido. No nosso estudo, não foi evidenciado o gigantismo, pois as condições utilizadas não favoreceram tal situação como: disponibilidade de recursos, a carga parasitária utilizada e o agrupamento dos moluscos adultos. Segundo Sorensen e Minchella (2001), moluscos adultos infectados com ≤ 5 miracídios exibem uma proporção de gigantismo de 36% no período pré-patente e que a condição de estarem agrupados também dificulta esse processo quando comparados aos moluscos mantidos isolados. Desta forma os padrões de crescimento (controle, expostos e positivos) estão de acordo com os descritos na literatura, onde apresentam uma fase de crescimento inicial lenta seguida de um período de crescimento rápido que vai até o advento da maturidade sexual, quando após a nova inflexão da curva o aumento de tamanho se torna lento e regular (Costa et al, 2004).

6.1.3 - Fecundidade e Fertilidade

Foi verificado que tanto os moluscos do grupo controle como os expostos que não eliminaram cercárias tiveram padrões semelhantes em relação à atividade reprodutiva (números de massa ovígera/molusco, ovos/moluscos e ovos/massa ovígera) nos períodos pré-patente e patente da infecção.

Os efeitos da larva do trematódeo na infecção dos moluscos são frequentemente específicos para cada sistema de trematódeo-molusco estudado (Pinheiro et al, 2009, Tunholi-Alves et al, 2010). As diferenças observadas podem ser atribuídas às espécies ou às cepas do parasito ou do hospedeiro, idade ou tamanho dos moluscos, do tempo de exposição, além de condições ambientais como temperatura e fotoperíodo nas quais os moluscos infectados são mantidos (Favre et al, 1997). Mesmo dentro de um único sistema parasito-hospedeiro *S.mansonii/B.glabrata* pode ser verificada uma variabilidade de efeitos sobre a biologia reprodutiva dos moluscos (Pan, 1965; Etges, 1965; Minchella, 1985).

A maioria dos dados encontrados na literatura registra a fecundidade dos moluscos infectados e dos expostos não infectados sem, contudo, separarem os moluscos que foram positivos no período patente da infecção. Além disso, os períodos de observação são sempre menores do que os avaliados neste estudo. Quanto aos moluscos positivos, um comportamento distinto foi observado: assim

que começaram a emergir cercárias aos 40 dias, verificou-se inicialmente redução da fecundidade e fertilidade, culminando na cessação da oviposição aos 55 dias. A redução na fecundidade associada ao final da fase larvar do desenvolvimento do *S.mansoni*, coincide com a depleção do estoque de energia, como aqueles representados pelos depósitos de glicogênio na glândula digestiva do molusco (Loker; Etges, 1979, Crews; Yoshino 1989, 1991 Pinheiro, 2003). Desta forma, os dados obtidos confirmam a existência do processo de castração parasitária, principalmente no período patente da infecção. Além disso, deve ser considerado o nível de suscetibilidade da população de molusco estudada, considerando apenas os moluscos infectados dentro de uma avaliação reprodutiva.

6.1.4 - Alterações nos Conteúdos de Glicose na Hemolinfa e de Glicogênio na Massa Cefalopodal e na Glândula Digestiva de *Biomphalaria glabrata* Experimentalmente Infectada com *Schistosoma mansoni*

Os resultados encontrados neste estudo mostraram estabilidade nos níveis de glicose nos moluscos infectados com 24 horas até o 14º dia de infecção. Thompson e Lee (1986) chamam esse processo de homeostasia glicêmica que é mantida e regulada por *B.glabrata* e pelos processos metabólicos desses moluscos. Quando os moluscos são submetidos a qualquer estresse oferecido pelo ambiente desencadeiam mecanismos para manutenção da homeostase, em função de sua sobrevivência (Becker, 1980). A partir do 42º dia de infecção, observa-se um aumento de glicose na corrente hemolinfática. Segundo Lima (2010) moluscos infectados por larvas de trematódeos, apresentam variações nos conteúdos de glicose circulante, pois ao serem consumidas pelas larvas, as moléculas de glicose são mobilizadas a partir da quebra do glicogênio nos tecidos de reservas dos moluscos.

Quanto aos níveis de carboidratos, pode ser visto que o aumento da glicose circulante coincide com o decréscimo de glicogênio nos tecidos, principalmente na glândula digestiva. Isso sugere que o estresse causado pela infecção tenha desencadeado processos compensatórios para obtenção de energia.

No primeiro dia de infecção, observa-se um aumento no conteúdo de glicogênio na massa cefalopodal, coincidindo com o momento em que ocorre a penetração do miracídio no tegumento do molusco e se transforma em esporocisto

primário. Este fato pode acarretado a quebra do glicogênio na glândula digestiva, liberando glicose na hemolinfa para a massa cefalopodal. Lima (2010) observou este fato, comparando moluscos infectados não expostos e expostos a *Euphorbia splendens* var. *hislopii*, observando que tanto o grupo controle quanto o exposto aumentou os conteúdos de glicogênio na massa cefalopodal após 24 horas de infecção.

A pressão da infecção foi mais significativa nos conteúdos de glicogênio na glândula digestiva, verificando uma redução ao longo da infecção. Este fato também foi observado por Mello-Silva et al. (2010).

6.1.5 - Histopatologia da Glândula Digestiva e Ototeste de *Biomphalaria glabrata* Infectada com *Schistosoma mansoni*

Diante dos resultados encontrados neste estudo, os moluscos demonstraram serem susceptíveis não sendo observado em seus tecidos a formação de granulomas. Este resultado é o contrário do que foi observado com linhagens de *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria straminea* por outros autores (Negrão-Côrrea et al 2007; Souza et al, 1995). Estes autores observaram à incompatibilidade a infecção associada à elevada efetividade do sistema de resistência dos moluscos e envolvimento do tecido circunjacente ao parasito.

Foi observado no ototeste parasitos como esporocistos em diferentes estágios de desenvolvimento (Figura 5.3). O ototeste apresentou uma região com atrofia e desaparecimento de células germinativas, que Pan (1965) relacionou à presença de esporocistos nos tecidos, onde pode ser observada uma redução do parênquima. O autor também relata que geralmente, após a 4ª e 6ª semana de infecção, ocorre uma congestão anormal dos seios hemolinfáticos, da cavidade debaixo da túnica da glândula digestiva e do ototeste.

Quanto à glândula digestiva, foi evidenciada a presença de formas larvares, porém, com tecido bem preservado. Pinheiro (2003) observou em infecção experimental com *Lymnaea columella* infectada *Echinostoma paraensei* que estrutura da glândula digestiva, foi completamente alterada em função do desenvolvimento larval intramolusco, mostrando que a pressão mecânica exercida pelas larvas, causa hiperatrofia dos ácinos da glândula. Pelo visto, os danos

causados ao molusco por *S.mansoni* são menores que os parasitos que apresentam estádios de rédias, já que na relação *S.mansoni-Biomphalaria* não ocorre uma espoliação direta no tecido do hospedeiro.

6.1.6 - Histoquímica da Glândula de Albúmen de *Biomphalaria glabrata* Infectada com *Schistosoma.mansoni*

Os resultados obtidos neste estudo confirmam a alteração do conteúdo de carboidrato da glândula de albúmen em decorrência da infecção por *S.mansoni* e ainda mostram que as alterações histológicas e bioquímicas estão relacionadas com o desenvolvimento da fase de esporocisto secundário. De fato, as maiores alterações na glândula de albúmen foram observadas a partir de 35 dias de infecção, desta forma, as alterações do conteúdo de carboidrato neste sítio estão diretamente relacionadas com a infecção. Sendo assim, a diminuição dos produtos de secreção desta glândula interfere na formação das massas ovígeras e na quantidade de ovos produzidos, sugerindo que quanto menor a quantidade de carboidratos (galactogênio) em função da infecção, menor será a fecundidade.

Embora se tenha na literatura à descrição do galactogênio como o único produto de secreção da glândula de albúmen, os resultados desse estudo sugerem a presença de carboidratos sulfatados pela coloração de Alcian blue pH 1.0 o que pode ser indício da síntese, mesmo que pequena, de outro(s) tipo(s) de carboidrato(s).

As alterações observadas durante as análises histopatológicas e histoquímicas da glândula de albúmen e histopatológicas do ovoteste fortalecem que a infecção pelo *S.mansoni* tem uma ação direta não somente sobre os tecidos do ovoteste e da glândula, mas também na produção dos ovos. Este fato, segundo Joosse e Elk (1986), está relacionado à ação dos hormônios que agem na atividade reprodutiva feminina dos moluscos. Há indícios de que esses hormônios estão presentes na hemolinfa dos moluscos infectados e que os parasitos interferem na ação desses hormônios, especialmente nas gônadas e órgãos sexuais acessórios. Desta forma, modificações no tamanho da glândula de albúmen e dos produtos de secreção dos seus ductos são mediadas pela ação hormonal que merecem estudos a posteriori.

6.1.7 - Castração Parasitária

Os resultados obtidos neste trabalho dão suporte à hipótese que o processo da castração parasitária ocorreu de modo direto. A interferência direta nas gônadas pela ação das larvas no interior do ovoteste, levou à interrupção da atividade ovipositória, o que por sua vez, diminuiu drasticamente a fecundidade e a fertilidade dos moluscos positivos no período patente. Foi possível também observar a castração indireta através das alterações fisiológicas causadas pela infecção, havendo redução dos depósitos de glicogênio, principalmente na glândula digestiva nos períodos estudados. Essas alterações podem determinar de forma significativa a castração parasitária, diminuindo os recursos energéticos do hospedeiro para a reprodução. A redução da fecundidade em moluscos infectados coincide com a migração e com o estabelecimento das larvas na glândula digestiva e nas gônadas (Crew; Yoshino, 1989), fato este confirmado neste trabalho no período patente da infecção.

Neste estudo os resultados vêm corroborar com Sullivan et al (1985) onde a castração pode seguir dois processos: i) primário e II) secundário. Os resultados da histoquímica para glândula de albúmen e exames histológicos para o ovoteste e glândula digestiva indicam um efeito primário. Foi possível observar quase que total destruição do ovoteste, órgão este responsável pela produção de gametas masculinos e femininos. Portanto, a destruição dos ácinos e parênquima em função da infecção, terão como consequência a interferência no processo reprodutivo do hospedeiro. Os resultados encontrados na histologia da glândula de albúmen para os polissacarídeos indicam que a produção de ovos está associada aos produtos de reservas desta glândula. A quantidade de material secretado pela glândula sofre a ação direta da infecção afetando este órgão; e uma vez que esteja estabelecida a infecção, alterações na sua constituição irão dificultar o processo de vitelogênese. Sendo assim, podemos também sugerir o processo indireto agindo neste órgão mediados por neurohormônios que interferem na reprodução (De Jong-Brink, 1995).

Loker; Etges (1979); Crews; Yoshino (1989, 1991) observaram que há uma redução da fecundidade de *B.glabrata* nas fases intermediárias e finais do ciclo biológico de *S.mansoni*, em torno de 40 dias de infecção, com queda na produção de ovos e redução de gasto energético bloqueando temporariamente o processo de

gametogênese. De acordo com De Jong-Brink (1995), as alterações na biologia reprodutiva dos moluscos em resposta à infecção com trematódeos depende do estágio de maturidade sexual dos moluscos. Quando estes ainda não atingiram a maturidade sexual, geralmente, os aparelhos reprodutores não completam o seu desenvolvimento; quando os moluscos já estão sexualmente maduros, a função reprodutiva é alterada, período em que foram observadas as alterações nos parâmetros analisados no presente trabalho. Contudo, não constatamos reversão da fecundidade quando análise foi observada em período semelhante, até 62 dias após a infecção, o que sugere a existência de diferentes mecanismos de interferência na fecundidade. Tem sido verificado que a destruição do ovoteste em decorrência da infecção pelo *S. mansoni* pode ocorrer de forma parcial (Azevedo et al, 2004) ou total (Crews; Yoshino 1989) o que nos leva a acreditar que o nível de castração seja dependente do estágio de comprometimento do ovoteste.

Em suma, este estudo contribuiu através de uma abordagem holística que incluíram a biologia reprodutiva, as alterações histopatológicas e histoquímicas, complementado com estudo das alterações fisiológicas (bioquímica), a compreensão dos processos envolvidos na castração parasitária.

De fato, Baudoin (1975) redefine o conceito de castração parasitária como um processo que envolve a destruição ou alteração do tecido gonadal, o comportamento reprodutivo, a modulação hormonal, ou outras modificações que resultem em redução da condição reprodutiva. Portanto, aliados a esses resultados, novos estudos devem ser elaborados para um maior entendimento da relação *S. mansoni* - *B. glabrata* que contemple os mecanismos hormonais que estão envolvidos no processo da reprodução levando a castração parasitária.

7 – CONCLUSÕES

1) Ocorreu a castração parasitária direta e indireta no modelo *Biomphalaria glabrata*, quando a infecção foi realizada na fase adulta (maturidade sexual), caracterizada pela diminuição da fecundidade e fertilidade;

2) Houve atrofia considerável do ovoteste com o desaparecimento quase que total das células germinativas e o estroma de sustentação formando uma rede aparentemente vazia;

3) A depleção de glicogênio nos tecidos está relacionada a mobilização de glicose para a corrente hemolinfática, sendo utilizada pelas formas larvares ao longo da infecção;

4) A glândula de albúmen também apresentou diminuição do conteúdo de secreção no interior dos ácinos em função da infecção pelo *S. mansoni*.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrade RM, Carvalho OS, Alves MDPP. Alimentação e fecundidade de planorbídeos criados em laboratório. II - *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848). Rev Brasil Biol. 1973; 33: 119-126.
- Azevedo CM, Borges CC, Andrade ZA. Behavior of *Schistosoma mansoni*-induced histopathological lesions in *Biomphalaria glabrata* submitted to ionizing radiation. Rev Soc Brasil Med Tropical. 2004; 37(3): 218-221.
- Azevedo VPB, Pinheiro J, Chagas GM, Gomes EM. Determinação do conteúdo de galactogênio na glândula de albúmen de *Bradibaena similis* (Férussac 1821) (Mollusca, Gastropoda). Rev Univ Rural. Ser.Ciênc.Vida.1996; 18(1-2): 95-99.
- Bai G, Johnston LA, Watson CO, Yoshino TP. Phenoloxidase activity in the reproductive system of *Biomphalaria glabrata*: role in egg production and effect of schistosome infection. J Parasitol. 1997; 83:852-858.
- Barbosa CS, Favre TC, Amaral RS, Pieri OS. Epidemiologia e controle da esquistossomose mansoni. "In": Carvalho O S, Coelho P M Z, Lenzi H L org. *Schistosoma mansoni* Esquistossomose uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2008. p.967-1008.
- Barbosa FS, Costa DP, Arruda F. New field observations on competitive displacement between two species of planorbid snails inhabiting north eastern Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1981; 76: 361-366.
- Barbosa FS, Costa DP, Arruda F. Competitive interactions between species of freshwater snails. I-Laboratory. Ia General methodology. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1983; 78: 335-341.
- Barbosa FS, Costa DP, Arruda F. Competitive interactions between species of freshwater snails. I – laboratory. I.b- Comparative studies of the dispersal and the vagility capabilities of *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria straminea*. Mem Inst Oswaldo Cruz.1984; 79: 163-167.
- Barbosa FS, Costa DP, Arruda F. Competitive interactions between species of freshwater snails. I-Laboratory. I.c- Comparative survival of *Biomphalaria glabrata*

- and *Biomphalaria straminea* kept out of water. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1985; 80: 155-157.
- Barbosa FS, Shanches O, Barbosa CS, Arruda F. Dynamics of snail populations of *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria straminea* under semi-natural conditions. Cad Saúde Pública. 1992; 8: 157-167.
- Barraco MA, Steil AA, Gargioni R. Morphological characterization of hemocytes of the pulmonate snail *Biomphalaria tenagophila* Mem Inst Oswaldo Cruz. 1993; 88: 73-83.
- Barretto AC. Esquistossomose mansônica na cidade do Salvador. Fund. Gonçalo Moniz. 1960. 16: 1-80.
- Baudoin M. Host Castration as a parasitic strategy. Evolution. 1975; 29: 335-352.
- Beck JT. The effects of an isopod castrator, *Probopyrus pandalicola*, on the sex characters of one its Caridean shrimp host *Palaemonetes paludosus*. Biol.Bull.1980;158: 1-15.
- Becker W. Untersuchungen über die aus der Muttersporocyste auswandernden Tochtterspocysten von *Schistosoma mansoni*. Z. Parasitenkd. 1968; 30: 233-251.
- Becker W . Metabolic interrelationships of parasitic trematodes and molluscs especially *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*. Z Parasitenkd. 1980; 63: 101-111.
- Bergquist RN. Schistosomiasis from risk assessment to control. Trends Parasitol. 2002;18: 309-314.
- Borges CMC, Souza PS, Andrade Z. Histopathologic features associated with susceptibility and resistance of *Biomphalaria* snails to infection with *Schistosoma mansoni*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1998; 93: 117-121.
- Brumpt E. Observation biologiques diverses concernant Planorbis (*Australorbis glabratus*) hôte intermediaire de *Schistosoma mansoni*. Ann Parasitol. 1941; 18(1): 9-45.
- Bruun B, Aagaard-Hansen J. The social context of schistosomiasis and its control: an introduction and annotated bibliography. TDR/UNICEF-UNDP/World Bank/WHO. 2008; 213.

- Campbel MK, Farrell SO. Bioquímica. Vol. 3, Bioquímica Metabólica. Thomson Learning, São Paulo. 2008; 332pp.
- Carvalho OS, Amaral RS, Dutra ,L V , Scholte RGC, Guerra MAM. Distribuição espacial de *Biomphalaria glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila*, hospedeiros intermediários de *Schistosoma mansoni* no Brasil. "In": Carvalho O S, Coelho P M Z, Lenzi H L org. *Schistosoma mansoni* Esquistossomose uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2008. 395-418.
- Cheng TC, Lee FO. Glucose levels in the mollusk *Biomphalaria glabrata* infectada with *Schistosoma mansoni*. J Invertbr Pathol 1971;18: 395-399.
- Coelho MV. Ação das formas larvárias de *Schistosoma mansoni* sobre a reprodução de *Australorbis glabratus*. Pub Avul Inst Aggeu Magalhães. 1954; 3(8): 39-54.
- Costa MJFS, Gault CE, Confalonieri UEC. Comparative study of the fecundity and fertility of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) and *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) in a laboratory through self-fertilization and cross-fertilization. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 2004; 46: 157-163.
- Cousin C, Ofori K , Acholonou S, Miller A, Richards C, Lewis F et al. *Schistosoma mansoni*: change in the albumen gland of *Biomphalaria glabrata* snail selected for nonsusceptibility to the parasite. J. Parasitol.1995; 81(6): 905-911.
- Crews AE and Yoshino TP. *Schistosoma mansoni*: Effect of infection on reproduction and gonadal growth in *Biomphalaria glabrata*. Exp Parasitol.1989; 68: 326-334.
- Crews AE and Yoshino TP. Influence of larva schistosomes on polysaccharide synthesis in albumen glands of *Biomphalaria glabrata*. Parasitology. 1990; 101: 351-359.
- De Jong-Brink, M . The effect of desiccation and starvation upon weight, histology and ultrastructural of the reproductive tract of *Biomphalaria glabrata*, intermediate host of *Schistosoma mansoni*. Z Zellforsch.1973; 136: 229-262.
- De Jong-Brink, M. How schistosomes profit from the stress responses they elicit in their host. Adv Parasitol. 1995; 35: 177-256.

- De Jong-Brink, M. Boer HH, Hommes TG, Kodde A. Spermatogenesis and role of Sertoli cells in freshwater snail *Biomphalaria glabrata*. Cell Tiss Res.1977; 181: 37-58.
- De Jong-Brink M, Wit A, Kraal G, Boer H H. A light and electron microscope study on oogenesis in the freshwater pulmonate snail *Biomphalaria glabrata*. Cell Tiss Res.1976; 171: 195-219.
- Etges FJ, Gresso W 1965. Effect of *Schistosoma mansoni* infection upon fecundity in *Australorbis glabratus*. J Parasitol. 1965; 51: 757-760.
- Favre TC, Bogéa T, Rotenberg L, Silva HS, Pieri OS. Circadian rhythms in the cercarial emergence of *Schistosoma mansoni* by *Biomphalaria tenagophila* at outdoor: a comparative study with *Biomphalaria glabrata*. Biological rhythm research.1997;28(5): 348-357.
- Favre T C , OS Piere , Zani LC , Ferreira JM , Domas GG, Beck LH, Barbosa CS. A longitudinal study on the natural infection of *Biomphalaria straminea* and *B.glabrata* by *Schistosoma mansoni* in an endemic area of schistosomiasis in pernambuco, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002; 97: 465-475.
- Favre TC, Pieri OS, Barbosa CS, Beck L. Avaliação das ações de controle da esquistossomose implementada entre 1977 e1996 em Pernambuco. Rev Soc Bra Med Trop 2001; 34: 569-76.
- Fernandez MA, Pieri O 2001. Infection by *Schistosoma mansoni*, Sambon 1907, in the first four months of life of *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001; 96: 185-192.
- Fernandez M.A. *Schistosoma mansoni* infections in the three months of life of sympatric intermediate host Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1997; 92: 27 -29.
- Ferrari A A A, Hofmann PRP. First registre of *Biomphalaria straminea* (Dunker,1848), in Santa Catarina state. Rev Inst Med Trop São Paulo.1992;34: 33-35.
- Ferreira CS. Análise bioquímica e equilíbrio ácido-base em *Biomphalaria glabrata* (Say,1818) hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni* (Sambon 1917) sob a exposição ao *Styphonodendron polyphyllum*(Martius, 1837) planta do

- cerrado brasileiro. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Goiás; 2006.
- Freitas JS, Paula DP, Cariello MO 1997. The influence of self- fertilization performance and copulation behaviour in reproduction by cross-fertilization in groups of *Biomphalaria tenagophila* (Mollusca, Planorbidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1997; 92: 739-743.
- Geraerts WPM , Joosse J .Freshwater snails (Basommatophora). "In": The Mollusca. Reproduction. Edited Tompa AS, Verdonk NH, Biggelaar JAM van den.1984; 7: 141-207.
- Grassi L, Jordá MT, Andrade Z, Cappa SMG. Short report: *Schistosoma mansoni* miracídias are killed by the defense system of an argentine strain of *Biomphalaria straminea*. Am J Trop Méd Hyg. 2001;65: 290-292.
- Guimarães CT, Soares DM , Andrade ZA , Souza CPS. Resistência de *Biomphalaria glabrata* à infecção pelo *Schistosoma mansoni*: variações no período pré- patente e na compatibilidade. Rev Soc Bras Med Trop. 1997; 30: 273-278.
- Hurd H. Host fecundity reduction: a strategy for damage limitation? Trends Parasitol. 2001; 17: 363-368.
- Ituarte FC. Grow dynamics in natural population of *Biomphalaria straminea* (Dunker 1848) from Bella Unión, Antigas, Uruguai. Studies Neot. Fauna and Envir. 1989; 24: 35-40.
- Joosse J. The hormone mollusc. Em: Janfer H & Dwner RGH Ed. Vol. 2, Vertebrate Endocrinology. Academic Press.New York.1988.
- Joosse J , Elk VR. *Trichobilharzia ocellata*: physiological characterization of giant growth, glycogen depletion, and absence of reproduction activity in the intermediate snail host, *Lymnaea stagnalis*. Exp Parasitol. 1986; 62: 1-13.
- Katz N, Peixoto SV. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil. Rev Soc Bras Med Trop. 2000; 33: 303-308.

- Kawazoe U 1977. Alguns aspectos da biologia de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) e *Biomphalaria tenagophila* (d'Orbigny, 1835). II-Fecundidade e Fertilidade. Rev Saude Publica 1977;11: 47-64.
- King C H. Global Health: Toward the Elimination of Schistosomiasis. N Engl J Med. 2009; 360 (2): 106-109.
- Kloss H, Souza CP, Gazzinelli, A, Soares-Filho B S, Temba, PC, Bethony J et al. The distribution of *Biomphalaria* spp. In the different habitats in relation to physical, biological, water and cognitive factors in a rural in Minas Gerais, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001; 96: 57-66.
- Kuris AM. Biological control: implications of the analogy between the tropical interactions of insect pest- parasitoid and snail-trematode systems. Exp. Parasitol. 1973; 33: 365-379.
- Lafferty KD, Kuris AM. Parasitic castration: the evolution and ecology body snatchers. Trends in Parasitol. 2009; 25(12): 564-572.
- Lemos QT, Andrade ZA. Sequencial histological changes in *Biomphalaria glabrata* during the course of *Schistosoma mansoni* infection. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001; 96: 719-712.
- Lima MG. Análise fisiológica da ação do Látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopii* N.E.S.(Euphorbiaceae) sobre *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (Pulmonata, Planorbidae) infectada por *Schistosoma mansoni*, 1907 (Trematoda, Schistosomatidae) associada ao tempo de Degradação do Látex. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 2010.
- Livingstone DR, de Zwaan A. Carbohydrate metabolism of gastropods. In The Mollusca. Metabolic Biochemistry and Molecular Biomechanics. P.W. Hochachka. Academic Press. USA. 1983; 1: 177-242.
- Loker DL, Etges FJ. Effect of *Schistosoma mansoni* infection on fecundity and perivitelline fluid composition in *Biomphalaria glabrata*. J. Parasitol. 1979; 65(6): 880-885.
- Loureiro S. A questão do social na epidemiologia e controle da esquistossomose mansônica. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1989; 84: 124-133.

- Malek EA, Cheng TC. Medical and economical malcological.Academia Press, New York.1974; 398.
- Meier M, Meier-Brook C. *Schistosoma mansoni*: Effect on growth, fertiliy, and development of distal male organs in *Biomphalaria glabrata* exposed to miracidia at different ages. Z Parasitenkd.1981; 66: 121-131.
- Mello-Silva CC, Gault CE, Costa VA, Barbosa FS. Possible hybrydization of brazilian planorbid snails and its importance in population dynamics. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1998 93: 227-232.
- Mello-Silva CC, Vilar MM, Bezerra JCB, Vasconcellos MC, Pinheiro,J , Rodrigues M L. Reproductive activity alterations on the *Biomphalaria glabrata* exposed to *Euphorbia splendens* var.hislopii látex. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007;102(6): 671-674.
- Mello-Silva CC, Vilar MM, Vasconcellos MC, Pinheiro J, Rodrigues, MLA. Carbohydrate metabolism alterations in *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni* and exposed to *Euphorbia splendens* var. *hislopii* latex. Mem Inst Oswaldo Cruz.2010;105(4): 492-495.
- Michelson E H. The effects of temperature on growth and reproduction of Australorbis glabatus in thelaboratory, Am. J. Hyg. 1961; 73: 66-74.
- Minchella DJ. Host life-history variation response to parasitism. Parasitol.1985; 90: 205-216.
- Minchella DJ, Loverde PT. A cost of increased early reproductive effort in the snail *Biomphalaria glabrata*. Am Naturalist. 1981; 118: 876-881.
- Ministério da Saúde. Guia de Vigilância epidemiológica. Secretaria de Vigilância em Saúde. Esquistossomose mansônica. Série A. Normas e Manuais Técnicos. 6ª edição. Brasília.Brasil.2005; 297-306.
- Motta MA, Melo AMMA. Fecundity changes induced by low-doses of gamma radiation on *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848). Mem Inst Oswaldo Cruz. 1997; 92: 559-561.

- Negrão-Corrêa D, Pereira CAJ, Rosa FM, Martins–Souza RL, Andrade ZA, Coelho PMZ. Molluscan resposta to parasite: *Biomphalaria* and *Schistosoma mansoni* interation. *Invert Surv Journal*. 2007; 4: 101-111.
- Pan CT. The general histology and topographic microanatomy of *Australorbis glabratus*. *Bulletin of Museum of Compararative Zoology*.Cambridge,Mass USA.1958; 119(3): 238-295.
- Pan CT. Studies on the host-parasite relationship between *Schistosoma mansoni* and the snail *Australorbis glabratus*. *Am. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1965;14: 931-976.
- Paraense WL. Autofecundação e fecundação cruzada em *Australorbis glabratus*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*; 1955; 53: 277.
- Paraense WL. A genetic approach to the systematics of planorbid molluscs.*Evolution*.1956; 10: 403-407.
- Paraense WL. Planorbídeos hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni*. In Cunha, AS da Esquistossomose mansoni. São Paulo, Livros Médicos. 1970; 13-30.
- Paraense WL. The sites of cross and self- fertilization in planorbid snails. *Rev Brasil Biol*. 1976; 36: 535-539.
- Paraense WL. Distribuição dos caramujos no Brasil. “In”: FA Reis et al. Modernos conhecimentos sobre esquistossomose mansônica. Biblioteca da Academia Mineira de Medicina.1986;117-126.
- Paraense WL. Histórico do gênero *Biomphalaria*, morfologia e sistemática morfológica. “In”: Carvalho O S, Coelho P M Z , Lenzi H L org. *Schistosoma mansoni* Esquistossomose uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2008.287-308.
- Paraense WL, Corrêa LR. Variation in susceptibility of populations of *Australorbis glabratus* to a strain of *Schistosoma mansoni*. *Rev Inst Trop São Paulo*. 1963; 5: 127-130.
- Paraense WL, Corrêa LR . A potential vector of *Schistosoma mansoni* in Uruguai. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 1989; 84: 281-288.

- Penido HM, Pinto DB, Deslandes N. Observações sobre as posturas e tempo de evolução de duas espécies de caramujos encontrados no Vale do Rio Doce. Rev Serv Esp Saúd Públ.1951; 4: 407-412.
- Perlowagora SA. Studies on the biologia of Australorbis glabratus, Schistosome-bearing brazilian snail. Rev Bras Malariol. Doenças Trop.1958; 10: 459-531.
- Pinheiro J. Morfologia e ultraestrutura dos ovos e estágios larvais de Echinostoma paraensei Lie & Basch 1967(Trematoda: Echinostomatidae) e fisiologia comparada da sua interação com Lymnaea columella Say, 1817(Molusca: Gastropoda), Rio de Janeiro /RJ.Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.Tese de Doutorado. 2003.
- Pinheiro J, Amato S A. Eurytrema coelomaticum (Digenea, Dicrocoeliidae):the effect of infection on carbohydrate contets of its intermediate snail host, Bradybaena similaris (Gastropoda, Xanthonychidae).Mem Inst Oswaldo Cruz.1994;89(3): 407-410.
- Pinheiro J, Gomes E M. A method for glycogen determination in molluscs. Arq Brás Biol Tecnol. 1994; 37: 569-576.
- Pinheiro, J, Maldonado, Jr A., Lanfredi, R.M., 2009. Physiological changes in Lymnaea columella (Say, 1817) (Mollusca, Gastropoda) in response to Echinostoma paraensei Lie and Basch, 1967(Trematoda: Echinostomatidae) infection. Parasitol Research. 2009; 106: 55-59.
- Rey L. *Parasitologia*, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 2008. 4a ed. 820pp.
- Rey L, Pessoa SB. Contribuição ao estudo dos focos de Australorbis glabratus (transmissor da esquistossomose mansônica) em Sergipe. Rev Clin São Paulo. 1953; 29: 85-108.
- Richards C S . Bulbous head growths of *Biomphalaria glabrata* : genetic studies.J. Invertebr Pathol.1973;22: 278- 283.
- Ritchie L S, Hernandez A, Amador RR. Biological potenciales of *A. glabratus*. Life span and reproduction. Am J Trop Méd Hyg. 1966;15: 614-617.

- Rozemberg B. Fecundity of *Biomphalaria straminea* and *Biomphalaria glabrata* in the laboratory: a twelve-month comparative study. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1992; 87: 223-232.
- Schall V, Massara CL, Enk M J , Barros H S . Os caminhos da esquistossomose no meio ambiente. n^o. 8, Parte II, Centro de Pesquisa René Rachou, Belo Horizonte. Série esquistossomose. 2007. 20pp.
- Schallig HD, Sassen MJ, Hordijk PI, de Jong-Brink M. *Trichobilharzia ocellata*: influence of infection on the fecundity of its intermediate snail host *Lymnaea stagnalis* and cercarial induction of the release of shistosomin, a snail neuropeptide antagonizing female gonadotrophic hormone. Parasitology. 1991; 102: 85-91.
- Sorensen RE, Minchella DJ. Snail-trematoda life history interactions: past trends and future directions. Parasitol 2001; 123: 3-18.
- Souza CP, Borges CC, Santana AG, Andrade ZA. Comparative histopathology of *Biomphalaria glabrata*, *B. tenagophila* and *B. straminea* with variable degrees of resistance to *Schistosoma mansoni* miracidia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1997; 92: 517-522.
- Souza CP, Cunha RCP, Andrade ZA. Development of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria tenagophila*, *Biomphalaria straminea* and *Biomphalaria glabrata*. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1995; 37: 201-206.
- Souza CP, Jannotti-Passos LK, Freitas JR. Degree of host-parasite compatibility between *Schistosoma mansoni* and their intermediate molluscan host in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1995; 90: 5-10.
- Souza CP, Lima LC. Moluscos de Interesse Parasitológico do Brasil. Série esquistossomose n^o 2, FIOCRUZ-CPqRR, Belo Horizonte, MG. 1997; 79.
- Souza RLM. Caracterização fenotípica e funcional de hemócitos circulantes de *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria tenagophila*, linhagens resistentes e susceptíveis, durante a infecção por *Schistosoma mansoni*. Tese de mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais; 2006.

- Stanislawsky E, Becker W. Influences of semi-synthetic diets starvation and infection with *Schistosoma mansoni* (Trematoda) on the metabolism of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda). *Comp Biochem Physiol*.1979; 63B: 527-533.
- Steinmann P, Keiser J , Bos R, Tanner M, Utzinger J .Scistosomiases and water recourses development:systematic review meta-analyis and estimates of people and risk. *The Lancet Infections Diseases*.2006; 6: 411-425.
- Sturrock BM, Sturrock RF. Laboratory studies on the host-parasite relationship of *Schistosoma mansoni* and *Biomphalaria glabrata* from St.Lucia, West Indies, *Ann Trop Med Parasitol*.1970; 64: 357-363.
- Sullivan JT, Gheng TC, Howland KH. Studies on parasitic castration of *Ilyanassa obsoleta* (Mollusca, Gastropoda) by several marine trematodes. *Trans Am Micros Soc*.1985; 104: 154-171.
- Teles HMS, Carvalho OS. Implicações da biologia de *Biomphalaria* no controle da esquistossomose."In": Carvalho OS, Coelho PMZ.*Schistosoma mansoni* Esquistossomose uma visão multidisciplinar.Editora Fiocruz.Rio de Janeiro. 2008. 459-484.
- Teles HMS, Pereira PA, Richinitti LM. Distribuição de *Biomphalaria* (Gastropoda, Planorbidae) nos estrados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, Brasil. *Rev Saúde Públ*. 1991. 25(5): 350-352.
- Teles HMS, Vaz JF Distribuição de *Biomphalaria straminea* (Dunker,1848) (Pulmonata,Planorbidae) no estado de São Paulo, Brasil.*Ciência & Cultura*.1988;173-176.
- Thiengo SC, Fernandez MA. Moluscos. In Amaral RS,Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica: diretrizes técnicas: Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose (PCE). 2ª ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde. 2008;13-35.
- Thompson SN, Lee RKW. Comparation of starvation and infection by *Schistosoma mansoni* on tissue viability and the 31p NMR sprectum of *Biomphalaria glabrata*. *Z Parasitenkd*.1986; 72: 417-421.

- Thornhill JA, Jones JT, Kusel J R. Increased ovoposition and growth in immature *Biomphalaria glabrata* after exposure to *Schistosoma mansoni*. Parasitol.1986; 93: 443-450.
- Tolosa EMC, Rodrigues CJ, Behmer OA, Neto AGF. Manual de técnicas para histologia. Normal e Patológica. 2ª ed. Barueri São Paulo. 2003; 331.
- Tunholi VM, Lustrino D, Alves-Tunholi MV, Mello-Siva, C.C., Maldonado Jr. A., Rodrigues, M L A, Pinheiro, J. Changes in reproductive biology of *Biomphalaria glabrata* infected with different doses of *Echinostoma paraensei* miracidia. J Invertebr Pathol. 2011; 106 (2) : 192-195.
- Vidigal THDA. Identificação específica e filogenia de moluscos neotropicais do gênero *Biomphalaria* através de técnicas de biologia molecular. Tese de Doutorado. Instituto Oswaldo Cruz. 2000.
- Walker J. The finding of *Biomphalaria straminea* amongst fish imported into Australia. World Health Organization. 1977. WHO/SCHISTO/78.46.
- WHO World Health Organization. Weekly epidemiological record. Schistosomiasis. 2011; 9: 73-90.
- Woodruff DS, Mulvey M, Yipp MW. The continued introduction of intermediate host snails of *Schistosoma mansoni* into Hong Kong. World Health Organization. 1985; 63: 621-622.
- Zang SM, Nian H, Wang B, Loker ES, Adema CM. Schistosomin from the snail *Biomphalaria glabrata*: expression studies suggest no involvement in trematode-mediated castration. Mol Biochem Parasitol.2009; 165: 79-86.

GLICOSE ENZIMÁTICA LÍQUIDA

BIOQUÍMICA CLÍNICA

FINALIDADE

Sistema enzimático para determinação da glicose no soro, plasma e demais líquidos biológicos.

Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

PRINCÍPIO

Ao adicionar-se glicose em uma solução tampão de fosfatos, contendo p-Hidroxibenzoato, 4-Aminoantipirina (4-AAP), Glicose Oxidase e Peroxidase processam-se as seguintes reações:



O produto formado pela oxidação de 4-Aminoantipirina (4- Antipirilquinonimina) é de coloração avermelhada e sua intensidade diretamente proporcional à concentração de glicose na solução. A cor avermelhada, formada pela reação, é medida em espectrofotômetro ou fotocolorímetro, com absorção máxima em 510nm, ou filtro verde.

PARTICULARIDADES DO SISTEMA

O reagente glicose enzimática líquida apresenta-se **pronto para uso**. Sua simplicidade torna-o método eleito para rotina de laboratórios, sendo ainda aplicável aos diversos sistemas de automação.

METODOLOGIA

Glicose Oxidase.

REAGENTES

Reagente de Cor: solução tampão de fosfatos 0,05M, pH 7,45 +/- 0,1, Aminoantipirina 0,03mM e 15mM de p-Hidroxibenzoato de sódio. Contém, ainda, um mínimo de 12kU de glicose oxidase e 0,8 KU de Peroxidase por litro.

Solução padrão 100mg/dL: solução aquosa contendo 100mg/dL de glicose.

APRESENTAÇÃO

	Ref. A	Kitão
Reagente de Cor	1 x 500mL	3 x 500mL
Solução padrão 100mg/dL	1 x 3mL	1 x 3mL

NÚMERO DE TESTES

Ref. A

Manual	500 testes
Automação (*)	1.200 testes

Kitão

Manual	1.500 testes
Automação (*)	3.600 testes

(*) A quantidade de testes na automação é variável de acordo com o equipamento.

Protocolos de automação encontram-se disponíveis no site Doles ou através do Serviço de Atendimento ao Consumidor.

EQUIPAMENTOS E MATERIAIS NECESSÁRIOS NÃO FORNECIDOS

Espectrofotômetro capaz de medir a absorvância em 510nm ou fotocolorímetro com filtro verde (490-540nm).

Tubos de ensaio.

Pipetas graduadas.

Pipeta semiautomática 10µL.

Banho maria (37°C).

Cronômetro.

Ponteiras descartáveis.

ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE DOS REAGENTES

Reagente de Cor: armazenar à temperatura de 2-8°C. Estável até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco, obedecidas as condições de armazenamento.

Solução padrão 100mg/dL: armazenar à temperatura de 2-8°C. Estável até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco, obedecidas as condições de armazenamento.

CUIDADOS E PRECAUÇÕES COM O USO DOS REAGENTES

Todos os reagentes são somente para **uso diagnóstico *in vitro***. Seu manuseio deve ser cuidadoso, evitando-se contato com pele e mucosas. Em caso de contaminação acidental lavar a parte afetada em água corrente. O descarte do material utilizado deverá ser feito obedecendo-se aos critérios de biossegurança estabelecidos pelo laboratório, de acordo com as normas locais, estaduais ou federais.

Observar a simbologia constante nos rótulos do produto:



Irritante

AMOSTRA

Soro, plasma, líquido e outros líquidos biológicos. A amostra deverá ser colhida com o paciente em jejum. Para obtenção de plasma utilizar anticoagulante contendo fluoreto - **Anticoagulante Glicose Doles**. **Todas as amostras biológicas devem ser consideradas como potencialmente infectantes.**



SAC: (62) 3269 0000 (Grande Goiânia)
SAC: 0800 644 6433 (Demais localidades)

www.doles.com.br

doles

1/4

PROCEDIMENTO TÉCNICO

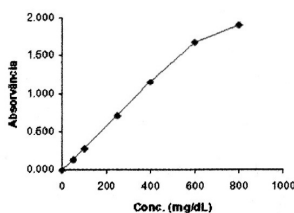
Rotular 3 tubos de ensaio com **B (branco)**, **T (teste)** e **P (padrão)**.

Proceder como segue:

	B	T	P
Reagente de Cor	1mL	1mL	1mL
Amostra	-	10µL	-
Solução Padrão	-	-	10µL

Misturar por agitação e incubar por 05 minutos em banho maria, a 37°C. Proceder à leitura das absorvâncias em **espectrofotômetro** ou **fotocolorímetro**, em **510nm** ou **filtro verde**, zerando o aparelho com o **branco**. A cor final da reação permanece estável por 20 minutos, à temperatura ambiente (20 - 30°C).

CURVA DE CALIBRAÇÃO



Padrão	Absorvância	Conc. (mg/dL)
1	0,000	0
2	0,137	50
3	0,280	100
4	0,715	250
5	1,150	400
6	1,680	600
7	1,900	800

Obs.: Não utilizar esta curva para determinar o resultado de seu ensaio

- A curva de calibração é a representação gráfica entre os valores das absorvâncias com os valores das concentrações de um conjunto de soluções padrão.
- A curva de calibração demonstra a linearidade da reação até uma determinada concentração, na qual pode ser determinado um fator de calibração (F), de acordo com a Lei de Beer.
- A reação é linear até 600mg/dL (ver curva acima). Obtendo-se valores mais elevados, dilui-se a amostra com solução fisiológica e procede-se à nova dosagem. Multiplicar o valor encontrado pelo fator de diluição.
- O kit de Glicose Enzimática Líquida Doles possui padrão no intervalo de linearidade da metodologia de Glicose Oxidase. O laboratório deve realizar o ensaio com o padrão que acompanha o kit e calcular seu fator de calibração (F), a exemplo do demonstrado nos cálculos abaixo.
- O fator deve ser refeito periodicamente e a cada lote do produto.

- Os padrões utilizados na montagem da curva de calibração foram preparados com produto de referência D-Glucose Standard Reference Material 917a procedência NACIONAL INSTITUTE of STANDARDS & TECHNOLOGY (NIST).

CÁLCULOS

$$\text{Glicose (mg/dL)} = \frac{\text{absorvância teste}}{\text{absorvância padrão}} \times 100$$

Exemplo: Padrão: 0,280 Teste: 0,230

$$\text{Glicose (mg/dL)} = \frac{0,230}{0,280} \times 100 = 82$$

Como a reação corada segue estritamente a lei de Beer, basta que se determine um **fator (F)** para cálculo dos resultados.

$$\text{Fator (F)} = \frac{100}{\text{absorvância padrão}}$$

Glicose mg/dL = absorvância teste x F
Para obtenção do fator, recomenda-se dosar em triplicata o padrão, ler as absorvâncias e tirar a média aritmética das mesmas.

Exemplo: Padrão: 0,283, 0,285, 0,284

$$\text{Média aritmética} = \frac{0,283 + 0,285 + 0,284}{3} = 0,284$$

$$\text{Fator (F)} = \frac{100}{0,284} = 352$$

Leitura do teste: 0,270

$$\text{Glicose (mg/dL)} = 0,270 \times 352 = 95$$

EXPRESSÃO DOS RESULTADOS EM UNIDADES S.I.

$$\text{Glicose (mmol/L)} = \text{Glicose (mg/dL)} \times 0,0555$$

LIMITAÇÕES DO SISTEMA

- Para se obter ótimo desempenho do sistema, é necessário que o procedimento técnico seja rigorosamente seguido conforme instruções de uso. Qualquer alteração poderá levar a resultados errôneos.
- A separação do plasma deverá ocorrer até duas horas após a coleta.
- No plasma refrigerado (2-8°C), a glicose permanece estável por três dias. Na ausência de fluoreto, a glicose é consumida pelo fenômeno de glicólise a um ritmo de 5% por hora.

2/4



SAC: (62) 3269 0000 (Grande Goiânia)
SAC: 0800 644 6433 (Demais localidades)

www.doles.com.br

doles

CONTROLE DA QUALIDADE DO SISTEMA

1. A limpeza e a secagem adequada do material a ser utilizado são de fundamental importância para a estabilidade dos reagentes e obtenção de resultados corretos.
2. O nível da água do banho maria deve ser superior ao nível dos reagentes nos tubos de ensaio. A temperatura (37°C) deve ser observada.
3. O uso de soro controle de referência deve ser uma prática rotineira do laboratório. Recomenda-se utilizar um soro controle com valor na faixa de normalidade (**soro controle N - Doles**) e outro soro controle de valor elevado (**soro controle P - Doles**).

VALORES DE REFERÊNCIA

É recomendado que cada laboratório estabeleça sua própria faixa de valores de referência na população atendida.

Como orientação, sugerimos os seguintes valores:

Plasma: (jejum de 8 horas) 70 - 99 mg/dL
Líquor: 40 - 70 mg/dL

Informações sobre os critérios para diagnóstico de diabetes podem ser obtidas no site da Sociedade Brasileira de Diabetes: www.diabetes.org.br.

SIGNIFICADO CLÍNICO

A dosagem da glicose sanguínea é o teste bioquímico mais realizado em laboratório. **Suas alterações não são simples marcadores de doença, mas o reflexo de profundas alterações no meio ambiente biológico.** A quantificação da glicose no sangue reflete apenas o ponto de equilíbrio momentâneo entre sua produção, utilização e estocagem.

O Diabetes representa um grupo de distúrbios metabólicos onde a glicose, mal utilizada, resulta em hiperglicemia. Os números que indicam a incidência de diabetes no Brasil são desconhecidos, mas admite-se que 5% da nossa população seja portadora de diabetes em seus diversos níveis. Atualmente, distingue-se no diabetes duas variedades principais:

Diabetes mellitus tipo 1 (IDDM- diabetes mellitus, insulino dependente).

Deficiência de insulina (insulino dependentes).

Há destruição de mais de 90% das células b das ilhotas de Langherans. Presença de anticorpos anti-insulina e anti-ilhotas de Langherans. Virose e toxinas químicas são os prováveis agentes causais. Ocorre geralmente em jovens (abaixo dos 30 anos) e representa, aproximadamente, 10% dos diabéticos. As complicações são frequentes. **Diabetes mellitus tipo 2 (NIDDM- diabetes mellitus não dependente de insulina).**

Níveis variados de insulina. Ausência de anticorpos anti-insulina e anti-ilhotas. Em geral os pacientes são obesos, com a presença de componente familiar. Incidência maior a partir dos 40 anos.

Considere-se ainda:

Diabetes mellitus secundária: síndrome diabética secundária à pancreatite, síndrome de Cushing, feocromocitoma, insuficiência hepática grave, terapia por corticoides, etc.

Diabetes mellitus gestacional: diabetes que se exterioriza durante a gravidez.

Tolerância de glicose alterada: glicemia basal entre 110 e 120 mg/dL, com alterações de curva glicêmica, ainda não conclusiva, de diabetes.

Grupos de risco: pacientes com hiperglicemia transitória, espontânea ou secundária a estímulos. Irmão monozigótico de portador de diabetes tipo 2. Pessoas com histórico familiar de diabetes. Obesos e membros de grupos raciais ou étnicos com alta incidência de diabetes.

A hipoglicemia tem como causas principais: o excesso de insulina pancreática, hipotireoidismo, insuficiência suprarenal, alcoolismo, uso não controlado de hipoglicemiantes orais, sendo ainda encontrada nas insuficiências hepáticas graves.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Especificidade: Foram realizados 71 testes em amostras cujo teor de glicose se situava no intervalo de 50 a 600mg/dL. Esses ensaios foram realizados em paralelo com uma metodologia similar (glicose oxidase). A comparação da Glicose Enzimática Líquida Doles (Y) com a metodologia mencionada (X) deu origem a seguinte equação de regressão linear: $y = 1,055X - 3,122$, sendo o coeficiente de correlação de 0,999.



SAC: (62) 3269 0000 (Grande Goiânia)
SAC: 0800 644 6433 (Demais localidades)

www.doles.com.br

doles

3/4

Sensibilidade: A sensibilidade foi verificada através de ensaios com teores 0,1 a 100mg/dL, sendo observado sensibilidade a partir de 0,39mg/dL. A sensibilidade do sistema está diretamente relacionada com a do aparelho utilizado no laboratório.

Diluição da matriz: O efeito de diluição da matriz foi verificado através de ensaios de diluições seriadas de amostra humana. Constatou-se com este ensaio que diluições sucessivas da matriz não interferem na sensibilidade diagnóstica do método.

Ensaio de Recuperação: A capacidade de recuperação do produto foi verificada através de misturas de proporções variadas de 02 amostras humanas com teores de 53 e 615mg/dL de glicose. Este estudo demonstrou índice de recuperação de 98 a 106%.

Reprodutibilidade: Foram realizados 20 ensaios de três amostras distintas, em diferentes dias, obteve-se os seguintes resultados:

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Concentração (mg/dL)	75,89	128,96	330,11
Desvio Padrão	1,69	3,34	8,46
Coefficiente de variação (%)	2,23	2,59	2,56

Repetitividade: Foram realizados 20 ensaios sucessivos, com três amostras, obteve-se os seguintes resultados:

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Concentração (mg/dL)	45,94	89,05	292,24
Desvio Padrão	1,04	1,04	3,11
Coefficiente de variação (%)	2,26	1,17	1,06

Substâncias interferentes: soros lipêmicos, hemolisados e ictericos podem causar resultados falsamente elevados. Nestes casos é recomendado que seja feito um branco da amostra (1,0mL do reagente de cor + 10µL do soro, leitura imediata). O uso de soros pode provocar valores falsamente diminuídos de glicose, quando não são separados em tempo hábil. Tal fato deve-se à presença de enzimas glicolíticas degradantes da glicose. Para

evitar tal ocorrência, recomenda-se a utilização de plasma colhido com fluoreto, o que irá impedir o fenômeno da glicólise. Certas drogas e outras substâncias podem afetar os valores da glicose. Para controle de interferências é recomendado que o paciente seja questionado quanto ao uso de medicamentos.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- Trinder, P.: *Ann. clin. biochem.*, 6-24, 1969.
- D. Barham e P. Trinder: *Analyst* 97, 1972.
- Jacobs D.S.: Kasten B.L.: Dematt W.R., Walfson W.L.: *Laboratory test handbook*, 2ª ed, 113, 1990.
- Pagana, K.D.: *Mosby's diagnostic and laboratory test reference*, 379 - 381, 1992
- Cockayne, Susan: *Clinical chemistry: Concepts and applications*, 156-158, 1993.
- Tibúrcio, H.M.: *Controle interno da qualidade analítica*, 1ªed. março/1995
- Henry, John Bernard: *Clinical diagnosis and management by laboratory methods*, 19ª ed, 194-207, 423-426, 1996.
- Doles: dados de arquivo

TERMOS E CONDIÇÕES DE GARANTIA DA QUALIDADE DO PRODUTO

As garantias do fabricante ao consumidor seguem estritamente as relacionadas na Lei nº 8.078, de 11 de setembro de 1.990 - Código de Defesa do Consumidor.

Os reagentes que compõem este sistema para diagnóstico são garantidos na sua performance, reprodutibilidade e qualidade até a data de vencimento.

Os produtos que apresentarem problemas técnicos comprovados serão substituídos, sem ônus para o consumidor.

Doles Reag. Equip. para Laboratórios Ltda.
CNPJ: 01.085.513/0001-05
Rodovia BR 153, Km 493, Lt.07
Conjunto Palmares.
CEP: 74775-027
Goiânia - GO - Brasil
e-mail: doles@doles.com.br

M.S.: nº 10231810084

Revisão: 11 (08/2010)

NBR ISO 9001
Sistema da Qualidade
certificado desde 1999

