

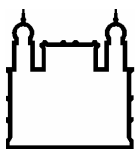
Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**Estudo da biologia e da histopatologia da infecção por *Echinostoma paraensei* (Platyhelminthes: Echinostomatidae) em *Biomphalaria glabrata* isolado de Sumidouro – RJ, *Biomphalaria tenagophila* isolado do Taim – RS e *Biomphalaria tenagophila* isolado de São José dos Campos – SP (Mollusca: Planorbidae).**

**MICHELE MARIA DOS SANTOS**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

Michele Maria dos Santos

**Estudo da biologia e da histopatologia da infecção por *Echinostoma paraensei* (Platyhelminthes: Echinostomatidae) em *Biomphalaria glabrata* isolado de Sumidouro – RJ, *Biomphalaria tenagophila* isolado do Taim – RS e *Biomphalaria tenagophila* isolado de São José dos Campos – SP (Mollusca: Planorbidae).**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz  
como parte dos requisitos para obtenção do título de  
Mestre em Biologia Parasitologia

**Orientador:** Prof. Dr. Arnaldo Maldonado Junior

**RIO DE JANEIRO**

**2009**

S237

Santos, Michele Maria

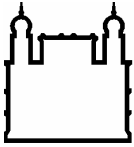
Estudo da biologia e da histopatologia da infecção por *Echinostoma paraensei* (Platyhelminthes: Echinostomatidae) em *Biomphalaria glabrata* isolado de Sumidouro – RJ, *Biomphalaria tenagophila* isolado do Taim – RS e *Biomphalaria tenagophila* isolado de São José dos Campos – SP (Mollusca: Planorbidae)/ Michele Maria dos Santos. – Rio de Janeiro, 2009.

Xiv, 70 f. : il. ; 30cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2009.  
Bibliografia: f. 58-70

1. Echinostoma paraensei 2. Interação 3. Biomphalaria tenagophila 4.  
Histopatologia I. Título

CDD 611 018



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

**Michele Maria dos Santos**

**Estudo da biologia e da histopatologia da infecção por *Echinostoma paraensei* (Platyhelminthes: Echinostomatidae) em *Biomphalaria glabrata* isolado de Sumidouro – RJ, *Biomphalaria tenagophila* isolado do Taim – RS e *Biomphalaria tenagophila* isolado de São José dos Campos – SP (Mollusca: Planorbidae).**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Arnaldo Maldonado Junior**

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dra. Rosângela Rodrigues e Silva - Presidente**

**Prof. Dr. Paulo Marcos Zech Coelho**

**Prof. Dra. Ester Maria Mota**

Rio de Janeiro, 2009

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, em primeiro lugar, por me dar alegria todos os dias, por toda proteção, consolo, amor, saúde, paz e por me guiar em todos os meus caminhos.

À minha mãe por todos os ensinamentos, companheirismo, luta e amor. Muito do que sou e tenho devo a ela. É a pessoa na qual me espelho todos os dias para ser um ser humano melhor.

Às minhas madrinhas queridas Cleide, Karla e Elaine, por estarem ao meu lado em todas as horas boas e ruins. Por todo amor, carinho, broncas e ensinamentos que me dão. Sem vocês, talvez eu não chegasse tão longe.

Ao meu irmão Rafael, por me proporcionar muitos momentos de felicidade, pela cumplicidade, honestidade e acima de tudo, carinho.

Ao Dr. Arnaldo Maldonado Jr. Junior por todos os ensinamentos, paciência, amizade e sinceridade. Orientador dos caminhos de seus alunos não só na vida profissional.

Ao Dr. Paulo Sérgio D'Andréa, por toda amizade e confiança a mim depositada.

A Dra. Lygia dos Reis Correa pelos ensinamentos de malacologia, os quais foram indispensáveis para a realização deste trabalho, por ceder espaço físico para a realização dos experimentos e por todos os conselhos dados.

Ao Dr. Lobato Paraense pelas obras escritas que foram de relevante importância para meu aprendizado.

Ao Dr. Zilton de Araújo Andrade por atender prontamente o pedido de colaboração deste trabalho e por todo ensinamento à mim dado de forma tão esclarecedora e simples.

Ao Dr. Paulo Marcos Zech Coelho, por se colocar à disposição no esclarecimento de dúvidas e por ceder a linhagem de moluscos resistentes utilizados em sua linha de pesquisa.

À Samaly dos Santos Souza, por toda colaboração e conhecimento a mim passado.

À Natalie Olifiers pelo auxílio nas análises estatísticas.

À Dra Rosana Gentile pelo incentivo, conhecimento científico e por se colocar à disposição no esclarecimento de dúvidas.

Ao Dr. Cláudio Bidau pelo incentivo.

Aos técnicos e amigos Sr. Paulo, Heloísa e Moisés do Laboratório de Malacologia – IOC – Fiocruz e André Campos Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres – IOC – Fiocruz. Sem a ajuda de vocês todo o trabalho seria realizado com maior dificuldade.

Aos amigos de trabalho Joyce, Raquel, Bernardo, Marconny, Vanderson, Ana Paula, Mary Anne, Liana, Marta Júlia, Michele Costa, Maria Carolina, Gláucio, Gustavo, Sócrates Neto, Juliana, Jeiel, Talitha, Douglas, Juberlan, Daniela, Luciana, Elisa, Carla, Danúbia, André Roque, Cristiane Ferro, Simone Bonecker.

À CAPES pelo financiamento deste projeto.

À Pós-graduação pela promoção de maiores conhecimentos e incentivo à pesquisa.

À Fiocruz, por realizar parte do meu sonho de fazer parte do quadro de funcionários da instituição.

A todos que de alguma forma ajudaram a tornar realidade este sonho.

## SUMÁRIO

INDICE DE TABELAS.....	ix
INDICE DE FIGURAS.....	xi
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1.INTRODUÇÃO.....	1
1.1- Características dos trematódeos da família Echinostomatidae.....	1
1.2- Características gerais de moluscos hospedeiros de trematódeos de importância médica veterinária.....	2
1.3- Biologia do trematódeo <i>Echinostoma paraensei</i> .....	3
1.4 – Estudo da interação molusco-parasito.....	4
1.4.1 - Aspectos biológicos e imunológicos.....	4
1.4.2 – Aspectos histopatológicos.....	6
1.4.2.1 – O modelo <i>Biomphalaria</i> spp – <i>Schistosoma mansoni</i> .....	6
1.4.2.2- O modelo <i>Biomphalaria</i> spp – <i>Echinostoma</i> spp.....	7
2.OBJETIVO GERAL.....	9
2.1- Objetivos específicos.....	9
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.1- Obtenção dos moluscos .....	10
3.2- Moluscos suscetíveis e resistentes.....	10
3.3- Manutenção do ciclo biológico de <i>Echinostoma paraensei</i> .....	11
3.4- Avaliação da suscetibilidade a infecção por <i>E. paraensei</i> .....	12
3.5- Avaliação da taxa de mortalidade, fecundidade e fertilidade dos moluscos após exposição a miracídios de <i>E. paraensei</i> .....	13
3.6- Estudo histopatológico dos isolados do molusco <i>Biomphalaria tenagophila</i> infectados.....	14
4. RESULTADOS.....	17
4.1- Estudo da Interação <i>Biomphalaria</i> spp.- <i>Echinostoma paraensei</i> .....	17
4.1.1- Mortalidade.....	17

4.1.2- Infectividade.....	18
4.1.3- Fecundidade e fertilidade.....	19
4.2- Análise histopatológica.....	21
5. DISCUSSÃO.....	49
5.1- Mortalidade.....	49
5.2- Infectividade.....	51
5.3 Fecundidade e Fertilidade.....	52
5.4 –Histopatologia.....	53
6.CONCLUSÕES.....	57
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58



## INDICE DE TABELAS

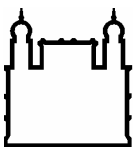
Tabela 3.1 – Delineamento experimental realizado para as análises biológicas dos moluscos neste trabalho.....	12
Tabela 3.2 – Delineamento experimental realizado para a análise histopatológica dos moluscos neste trabalho.....	15
Tabela 4.1 - Mortalidade semanal de <i>Biomphalaria tenagophila</i> isolado da Reserva do Taim, RS após a exposição a 10, 25, 50 ou 100 miracídios de <i>Echinostoma paraensei</i> ; MNEC – moluscos não eliminando cercárias; MEC – moluscos eliminando cercárias; MNE – moluscos não expostos (Número de moluscos).....	23
Tabela 4.2 - Mortalidade semanal de <i>Biomphalaria glabrata</i> isolado do município de Sumidouro, RJ após a exposição a 10, 25, 50 ou 100 miracídios de <i>Echinostoma paraensei</i> ; MNEC – moluscos não eliminando cercárias; MEC – moluscos eliminando cercárias; MNE – moluscos não expostos (Número de moluscos).....	24
Tabela 4.3 - Mortalidade semanal de <i>Biomphalaria tenagophila</i> isolado do município de São José dos Campos, SP após a exposição a 10, 25, 50 ou 100 miracídios de <i>Echinostoma paraensei</i> ; MNEC – moluscos não eliminando cercárias; MEC – moluscos eliminando cercárias; MNE – moluscos não expostos (Número de moluscos).....	25
Tabela 4.4 - Infectividade e média semanal de cercárias eliminadas por <i>Biomphalaria tenagophila</i> isolado da Reserva do Taim, RS após a exposição a 10, 25, 50 ou 100 miracídios de <i>Echinostoma paraensei</i> .....	26
Tabela 4.5 - Infectividade e média semanal de cercárias eliminadas por <i>Biomphalaria glabrata</i> isolado do município de Sumidouro, RJ após a exposição a 10, 25, 50 ou 100 miracídios de <i>Echinostoma paraensei</i> .....	27
Tabela 4.6 - Infectividade e média semanal de cercárias eliminadas por <i>Biomphalaria tenagophila</i> isolado do município de São José dos Campos, SP após a exposição a 10, 25, 50 ou 100 miracídios de <i>Echinostoma paraensei</i> .....	28
Tabela 4.7 - Média semanal de desovas de <i>Biomphalaria tenagophila</i> isolado da Reserva do Taim, RS após a exposição a 10, 25, 50 ou 100 miracídios de <i>Echinostoma paraensei</i> ; MNEC – moluscos não eliminando cercárias; MEC – moluscos eliminando cercárias; MNE – moluscos não expostos.....	29
Tabela 4.8 - Média semanal de ovos por desova de <i>Biomphalaria tenagophila</i> isolado da Reserva do Taim, RS após a exposição a 10, 25, 50 ou 100 miracídios de <i>Echinostoma paraensei</i> ; MNEC – moluscos não eliminando cercárias; MEC – moluscos eliminando cercárias; MNE – moluscos não expostos.....	30
Tabela 4.9 - Média semanal de ovos férteis por desova de <i>Biomphalaria tenagophila</i> isolado da Reserva do Taim, RS após a exposição a 10, 25, 50 ou 100 miracídios de <i>Echinostoma paraensei</i> ; MNEC – moluscos não eliminando cercárias; MEC – moluscos eliminando cercárias; MNE – moluscos não expostos.....	31

Tabela 4.10 - Média semanal de desovas de <i>Biomphalaria glabrata</i> isolado do município de Sumidouro, RJ após a exposição a 10, 25, 50 ou 100 miracídios de <i>Echinostoma paraensei</i> ; MNEC – moluscos não eliminando cercárias; MEC – moluscos eliminando cercárias; MNE – moluscos não expostos; (-) = Não há moluscos vivos.....	32
Tabela 4.11 - Média semanal de ovos por desova de <i>Biomphalaria glabrata</i> isolado do município de Sumidouro, RJ após a exposição a 10, 25, 50 ou 100 miracídios de <i>Echinostoma paraensei</i> ; MNEC – moluscos não eliminando cercárias; MEC – moluscos eliminando cercárias; MNE – moluscos não expostos; (-) = Não há moluscos vivos.....	33
Tabela 4.12 - Média semanal de ovos férteis por desova de <i>Biomphalaria glabrata</i> isolado do município de Sumidouro, RJ após a exposição a 10, 25, 50 ou 100 miracídios de <i>Echinostoma paraensei</i> ; MNEC – moluscos não eliminando cercárias; MEC – moluscos eliminando cercárias; MNE – moluscos não expostos.....	34
Tabela 4.13 - Média semanal de desovas de <i>Biomphalaria tenagophila</i> isolado do município de São José dos Campos, SP após a exposição a 10, 25, 50 ou 100 miracídios de <i>Echinostoma paraensei</i> ; MNEC – moluscos não eliminando cercárias; MEC – moluscos eliminando cercárias; MNE – moluscos não expostos; (-) = Não há moluscos vivos.....	35
Tabela 4.14 - Média semanal de ovos por desova de <i>Biomphalaria tenagophila</i> isolado do município de São José dos Campos, SP após a exposição a 10, 25, 50 ou 100 miracídios de <i>Echinostoma paraensei</i> ; MNEC – moluscos não eliminando cercárias; MEC – moluscos eliminando cercárias; MNE – moluscos não expostos; (-) = Não há moluscos vivos.....	36
Tabela 4.15 - Média semanal de ovos férteis por desova de <i>Biomphalaria tenagophila</i> isolado do município de São José dos Campos, SP após a exposição a 10, 25, 50 ou 100 miracídios de <i>Echinostoma paraensei</i> ; MNEC – moluscos não eliminando cercárias; MEC – moluscos eliminando cercárias; MNE – moluscos não expostos; (-) = Não há moluscos vivos.....	37
Tabela 4.16 – Análise de variância de medidas repetidas das desovas, ovos e ovos férteis postos entre os moluscos eliminadores de cercárias (E), não eliminadores de cercárias (NE) e pertencentes ao grupo controle não exposto a miracídios (C) e os períodos (P) pré-patente e patente. Valores de significância: $p < 0,05$ (*). $P < 0,01$ (**) e $p < 0,001$ (***); NS (Não significante).	38
Tabela 4.17 – Análise de variância de medidas repetidas entre as desovas, ovos e ovos férteis postos por moluscos eliminadores de cercárias, não eliminadores de cercárias e pertencentes ao grupo controle não exposto a miracídios, as doses de miracídios (DM) a que os moluscos foram expostos e os períodos (P) pré-patente e patente. Valores de significância: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) e $p < 0,001$ (***); NS (Não significante).	39
Tabela 4.18 – Análise de variância de medidas repetidas entre as desovas, ovos, ovos férteis postos por moluscos eliminadores de cercárias, e número de cercárias eliminadas e as doses de miracídios (DM) utilizadas na exposição e os períodos (P) pré-patente e patente. Valores de significância: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) e $p < 0,001$ (***); NS (Não significante).	40

## INDICE DE FIGURAS

Figura 4.1: Saco pericárdico de <i>Biomphalaria tenagophila</i> isolado do Taim, RS, apresentando acúmulo de formas parasitárias de <i>Echinostoma paraensei</i> e ausência de hemócitos na região. Ao centro encontra-se o coração. Microscopia óptica. Hematoxilina & Eosina, X 100.....	42
Figura 4.2: Saco pericárdico de <i>Biomphalaria tenagophila</i> isolado do Taim, RS, apresentando tamanho aumentado devido ao elevado número de formas parasitárias de <i>Echinostoma paraensei</i> acumuladas. Microscopia óptica. Hematoxilina & Eosina, X 100.....	42
Figura 4.3: Glândula digestiva de <i>Biomphalaria tenagophila</i> isolado do Taim, RS, apresentando algumas formas parasitárias de <i>Echinostoma paraensei</i> e ausência de hemócitos na região. Microscopia óptica. Hematoxilina & Eosina, X 40.....	42
Figura 4.4: Ovoteste de <i>Biomphalaria tenagophila</i> isolado do Taim, RS, apresentando formas parasitárias de <i>Echinostoma paraensei</i> e remanescentes destruídos de células da própria região. Presença de proliferação focal de hemócitos encapsulando tanto alguns remanescentes de células da região quanto as formas parasitárias. Microscopia óptica. Hematoxilina & Eosina, X 200.....	42
Figura 4.5: Coração de <i>Biomphalaria tenagophila</i> isolado de São José dos Campos, SP, apresentando infiltrados de hemócitos na cavidade e ausência de formas parasitárias de <i>Echinostoma paraensei</i> . Microscopia óptica. Hematoxilina & Eosina, X 200.....	44
Figura 4.6: Região próxima aos túbulos renais de <i>Biomphalaria tenagophila</i> isolado de São José dos Campos, SP, apresentando proliferação focal de hemócitos encapsulando forma parasitária de <i>Echinostoma paraensei</i> . Microscopia óptica. Hematoxilina & Eosina, X 100.....	44
Figura 4.7: Detalhe da figura anterior, apresentando proliferação focal de hemócitos encapsulando a forma parasitária de <i>Echinostoma paraensei</i> . Microscopia óptica. Hematoxilina & Eosina, X 400.....	44
Figura 4.8: Região dos túbulos renais de <i>Biomphalaria tenagophila</i> isolado de São José dos Campos, SP, apresentando reação inflamatória contra a forma parasitária de <i>Echinostoma paraensei</i> com alteração do tecido local (A). Presença de infiltrados inflamatórios em determinados locais. B= Tecido original. Microscopia óptica. Hematoxilina & Eosina, X 100.....	46
Figura 4.9: Região do ovoteste de <i>Biomphalaria tenagophila</i> isolado de São José dos Campos, SP apresentando poucos remanescentes de células que compõem o ovoteste. GD= Glândula digestiva. Microscopia óptica. Hematoxilina & Eosina, X 40.....	46

Figura 4.10: Detalhe da figura anterior, apresentando remanescentes de células que compõem o ovoteste e infiltrados inflamatórios aparentes. Microscopia óptica. Hematoxilina & Eosina, X 100.....	46
Figura 4.11: Coração (C) e Região dos túbulos renais (TR) de <i>Biomphalaria tenagophila</i> pertencente ao grupo controle não exposto a miracídios de <i>Echinostoma paraensei</i> . Microscopia óptica. Hematoxilina & Eosina, X 100.....	48
Figura 4.12: Glândula digestiva (GD) de <i>Biomphalaria tenagophila</i> pertencente ao grupo controle não exposto a miracídios de <i>Echinostoma paraensei</i> . Microscopia óptica. Hematoxilina & Eosina, X 100.....	48
Figura 4.13: Ovoteste de <i>Biomphalaria tenagophila</i> pertencente ao grupo controle não exposto a miracídios de <i>Echinostoma paraensei</i> . Microscopia óptica. Hematoxilina & Eosina, X 40.....	48



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

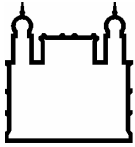
**Estudo da biologia e da histopatologia da infecção por *Echinostoma paraensei* (Platyhelminthes: Echinostomatidae) em *Biomphalaria glabrata* isolado de Sumidouro – RJ, *Biomphalaria tenagophila* isolado do Taim – RS e *Biomphalaria tenagophila* isolado de São José dos Campos – SP (Mollusca: Planorbidae).**

### RESUMO

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Michele Maria dos Santos

Estudos acerca da interação molusco-parasito são relevantes para o entendimento dos mecanismos pelos quais algumas espécies ou linhagens de moluscos apresentam-se resistentes ou suscetíveis à infecção a determinados trematódeos. Neste trabalho, *Biomphalaria glabrata* (isolado do município de Sumidouro, RJ) e as linhagens *Biomphalaria tenagophila* (isolado do município de São José dos Campos, SP) e *Biomphalaria tenagophila* (isolado da Reserva do Taim, RS) foram observados após a infecção por *Echinostoma paraensei* quanto à mortalidade, taxa de infecção, fecundidade e fertilidade. Além disso, estudos histológicos foram realizados no intuito de observar a reação do sistema de defesa interno destes hospedeiros ao parasito. Em relação à suscetibilidade, *B. glabrata* (SU) foi a mais suscetível, tendo moluscos eliminando cercárias em todas as doses de miracídios, seguida por *B. tenagophila* (Taim) e *B. tenagophila* (SJC). A taxa de infectividade foi maior na primeira espécie seguida por *B. tenagophila* (Taim). Nestas a infectividade se mostrou dependente da dose de miracídios utilizada, ou seja, quanto maior a dose de miracídios, maior a taxa de moluscos infectados. Por outro lado, *B. tenagophila* (SJC) foi a menos suscetível, apresentando a menor taxa de infectividade, a qual foi dependente da dose de miracídios utilizada. Em relação à mortalidade, *B. tenagophila* (Taim) apresentou as menores taxas, seguida por *B. glabrata* (SU). Entretanto *B. tenagophila* (SJC) apresentou as maiores taxas de mortalidade. As doses de miracídios utilizadas não influenciaram no número de cercárias eliminadas. A fecundidade e fertilidade foram influenciadas pela infecção. Nos moluscos que eliminaram cercárias houve uma redução na fecundidade e na fertilidade, enquanto a maioria dos moluscos que não eliminou cercárias apresentou fecundidade e fertilidade similares às dos controles não expostos a miracídios, suportando a hipótese de interferência parasitária na biologia do molusco.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### **Study of the biology and histopathology by the infection of *Echinostoma paraensei* (Platyhelminthes: Echinostomatidae) in *Biomphalaria glabrata* Sumidouro – RJ isolate, *Biomphalaria tenagophila* Taim – RS isolate and *Biomphalaria tenagophila* São José dos Campos – SP isolate (Mollusca: Planorbidae).**

#### ABSTRACT

**Michele Maria dos Santos**

Studies on the snail-trematode interaction are relevant to the knowledge of the mechanisms by which some molluscs species or strains become susceptible or resistant to determined trematode infections. In this work, the mortality rate, infectivity rate, fecundity and fertility of *Biomphalaria glabrata* (isolate from Sumidouro, RJ) and of the strains *Biomphalaria tenagophila* (isolate from São José dos Campos, SP) and *Biomphalaria tenagophila* (isolado da Reserva do Taim, RS) were observed after exposure to *Echinostoma paraensei* miracidia. In addition, studies on the molluscs histology were made to observe possible reactions of hosts' internal defense system to the parasite. In relation to the susceptibility, *B. glabrata* (SU) was the most susceptible of the species studied, in this specie cercarial emergency occurred in molluscs of all the miracidia challenge doses, followed by *B. tenagophila* (Taim) and *B. tenagophila* (SJC). The infectivity rate was higher in *B. glabrata* (SU), followed by *B. tenagophila* (Taim). In these species, the infectivity rate was miracidia dose dependent. Otherwise, *B. tenagophila* (SJC) was the less susceptible specie presenting the lowest infectivity rates which were miracidia dose dependent. About mortality, while *B. tenagophila* (Taim) had the lowest rates, followed by *B. glabrata* (SU), *B. tenagophila* (SJC) had the highest mortality rates. Miracidia doses of the challenge did not influenced the number of cercariae release. The infection has influenced molluscs' fecundity and fertility. In molluscs which had cercarial emergency, a reduction on fecundity and fertility was observed, while most of the molluscs that did not present cercarial emergency had fecundity and fertility similar to the controls not exposed. These results support the hypothesis of trematode interferences on hosts biology.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1- Características dos trematódeos da família Echinostomatidae.

Os representantes da família Echinostomatidae são trematódeos digenéticos que possuem ampla distribuição geográfica e algumas espécies são encontradas na Ásia, Europa e Américas. Geralmente são encontrados parasitando aves e mamíferos silvestres e domésticos, incluindo o homem. (Lutz, 1924; Kostadinova & Gibson, 2000). Muitos possuem hábitos hematófagos, o que os tornam parasitos de relevante importância médica e econômica. Costumam infectar a maioria dos órgãos da cavidade abdominal, como os dos sistemas digestivo, excretor e reprodutor. A manutenção do ciclo de algumas espécies dessa família tem servido como modelo experimental por ser de fácil manutenção e pouco onerosa (Kanev et al., 2000; Toledo et al., 2007).

Morfologicamente, são caracterizados por apresentarem um ou dois colares compostos por grandes espinhos envolvendo a região oral e interrompidos na face ventral. O padrão em que os espinhos se encontram organizados e o tamanho destes é fundamental para se caracterizar o gênero e até mesmo a espécie dos trematódeos pertencentes a esta família (Kostadinova & Gibson, 2000) .

Na família Echinostomatidae, diversos gêneros pertencentes à subfamília Echinostomatinae como *Echinostoma*, *Echinoparyphium*, *Hypoderaeum*, *Petasiger*, *Euparyphium*, *Isthmiophora* e outros têm sido bastante estudados. Dentre estes, *Echinostoma* e *Echinoparyphium* são os mais complexos e incluem o maior número de espécies e números de espinhos no colar cefálico variando de 27 a 51 e 43 a 45 respectivamente (Kostadinova & Gibson, 2000; Maldonado Jr. & Lanfredi, 2009).

As características, tais como número de espinhos no colar, ciclo biológico e outras, utilizadas para classificar as espécies nos gêneros *Echinostoma* e *Echinoparyphium* seguem características similares às das espécies consideradas como espécies tipo de tais gêneros e que acabam por considerá-los como grandes grupos. No caso de *Echinostoma*, algumas espécies compreendidas neste gênero são consideradas pertencentes ao grupo “*revolutum*” uma vez que sua espécie tipo é *Echinostoma revolutum* possuindo 37 espinhos no colar cefálico. *Echinoparyphium*, por sua vez, compreende algumas espécies consideradas pertencentes ao grupo “*recurvatum*” uma vez que sua espécie tipo é *Echinoparyphium recurvatum* possuindo

de 43 a 45 espinhos no colar cefálico (Kostadinova & Gibson, 2000; Maldonado Jr. & Lanfredi, 2009).

Em geral, possuem ciclo biológico composto por sete fases evolutivas: adulto, ovo, miracídio, esporocisto, rédia, cercária e metacercária, e três categorias de hospedeiros, conhecidos como hospedeiro definitivo, primeiro e segundo hospedeiros intermediários. Os hospedeiros definitivos são animais vertebrados dentro dos quais se desenvolvem os vermes adultos. Os primeiros hospedeiros intermediários são moluscos límnicos e marinhos pertencentes a vários gêneros, principalmente *Physa*, *Lymnaea*, *Helisoma* e *Bulinus* nos quais se desenvolvem os esporocistos, rédias e cercárias. Os hospedeiros intermediários secundários são alguns anfíbios e moluscos límnicos e marinhos nos quais as metacercárias se desenvolvem (Kostadinova & Gibson, 2000; Davis, 2005; Detwiler & Minchella, 2009).

## **1.2- Características gerais de moluscos hospedeiros de trematódeos de importância médica veterinária.**

O filo Mollusca abrange um dos grupos de organismos do Reino Animal que se destaca devido a sua diversidade e adaptações ambientais, ocupando habitats marinhos, dulcícolas e terrestres. É constituído por sete classes (Gastropoda, Polyplacophora, Cephalopoda, Bivalvia, Scaphopoda, Aplacophora e Monoplacophora), das quais Gastropoda é a de maior sucesso adaptativo e de grande importância médica e veterinária por incluir espécies hospedeiras intermediárias de parasitos humanos e de animais (Lima, 2005).

No Brasil, dentre os representantes da classe gastrópoda, o gênero *Biomphalaria* apresenta grande importância devido a sua ampla distribuição geográfica e por algumas espécies atuarem como hospedeiras intermediárias de diversas espécies de trematódeos de importância médica e veterinária (Carvalho et al., 2005a, 2005b).

Muitos trematódeos conseguem alterar o fenótipo e o comportamento de seus hospedeiros intermediários, facilitando sua transmissão ao hospedeiro definitivo (Thomas et al., 1998; McCurdy et al., 2000). A inter-relação entre indivíduos em uma população de parasitos ou subpopulação pode ter implicações importantes para a evolução de suas características e comportamento. Por outro lado, modelos teóricos predizem que as características dos parasitos como taxas de crescimento, virulência e



manipulação do hospedeiro, podem ser influenciadas pela relação dos parasitos com seus hospedeiros (Parker et al., 2003).

### **1.3- Biologia do trematódeo *Echinostoma paraensei*.**

O trematódeo *Echinostoma paraensei* foi descrito no Brasil a partir de *Biomphalaria glabrata* coletadas naturalmente infectadas no Estado de Minas Gerais, e seu ciclo biológico foi desenvolvido em laboratório utilizando-se roedores como hospedeiros definitivos (Lie & Basch, 1967).

Recentemente, Maldonado Jr. et al. (2001a), isolaram *E. paraensei* a partir do roedor silvestre *Nectomys squamipes* proveniente do município de Sumidouro, Estado do Rio de Janeiro, sendo este, portanto, considerado o hospedeiro definitivo natural do parasito (Maldonado Jr. et al., 2006). O espécime isolado foi caracterizado através de microscopia de luz, microscopia de varredura e seqüências moleculares do espaçador ribossomal interno ITS 1-2 (Maldonado Jr. et al., 2001a).

O ciclo biológico do *E. paraensei* foi reestudado, confirmando-se sua compatibilidade apenas para mamíferos (*Mesocricetus auratus*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus* e *N. squamipes*) e sua incompatibilidade para se desenvolver em aves. Além disso, foi observada a sua compatibilidade com os moluscos simpátricos *Lymnaea collumela*, *Physa marmorata* e *Biomphalaria glabrata* (Maldonado Jr. et al., 2001b).

Estudos *in vitro* comprovam que os produtos de excreção e secreção liberados pelos miracídios de *E. paraensei* são capazes de interferir na função dos hemócitos, ou seja na habilidade dos hemócitos em proliferar, aderir à superfície das formas larvais e fagocitá-las, inibindo, assim, a destruição das mesmas e garantindo, desta forma o desenvolvimento das formas larvais intramolusco (Loker et al., 1987; Loker et al., 1992; DeGaffé & Loker, 1998).

É necessário um número maior de investigações acerca da biologia deste parasito, principalmente às que se destinam ao estudo sobre o controle da Schistosomose mansônica, uma vez que *E. paraensei* e *S. mansoni* têm *B. glabrata* como hospedeiro intermediário natural e o roedor *N. squamipes* como hospedeiro definitivo natural. Uma vez que os parasitos da família Echinostomatidae são capazes de interferir na resposta imunológica dos seus hospedeiros intermediários, são indispensáveis estudos mais aprofundados sobre a possibilidade de interferência

parasitária de *E. paraensei* sobre *S. mansoni*, ou seja, sobre o possível favorecimento de infecção por *S. mansoni* dos moluscos previamente infectados por *E. paraensei*.

#### **1.4 - Estudo da interação molusco-parasito:**

##### **1.4.1 - Aspectos biológicos e imunológicos:**

Estudos sobre a interação molusco-parasito têm se mostrado relevantes para o entendimento dos mecanismos pelos quais algumas espécies ou linhagens de moluscos apresentam-se resistentes ou suscetíveis à infecção. Aspectos dessa interação estão relacionados a parâmetros bionômicos tais como, crescimento, reprodução, locomoção e sobrevivência assim como, a condição imunológica e a mudanças bioquímicas nos tecidos do hospedeiro induzidas pelos estágios de desenvolvimento intramolusco do parasito (El-Ansary & Al-Daihan, 2006).

Os esporocistos de *Echinostoma paraensei* desenvolvem-se no ventrículo. Estes evoluem a rédias mães que deixam o coração e migram para outros tecidos. As rédias mães evoluem a rédias filhas, que colonizam principalmente a glândula digestiva, ovoteste e outras partes do molusco. Evadir ou subverter o sistema de defesa de seus hospedeiros intermediários com a finalidade de garantir seu desenvolvimento é um dos desafios encontrados pelos trematódeos digenéticos (Loker & Adema, 1995).

Segundo Ratcliffe (1985) e Trager (1986), a defesa celular nos moluscos é mediada por amebócitos (hemócitos) presentes na hemolinfa e inclui processos de fagocitose, formação de granulomas, coagulação da hemolinfa e cicatrização. A defesa humoral compreende a ação de lisinas, aglutininas, fatores antimicrobianos e substâncias com ação semelhante as linfocinas. Em seus experimentos, Balan et al. (1993), não observaram reações hemocitárias em torno dos esporocistos de *S. mansoni*, sugerindo que não houve participação direta dos hemócitos na destruição da larva de *S. mansoni*, e que possivelmente fatores da hemolinfa (excluindo-se as células) estariam envolvidos na destruição do parasito.

O sistema de defesa inato dos invertebrados, o qual é representado principalmente pelos receptores de superfície dos hemócitos, reconhecem elementos estranhos ao organismo, sendo de grande eficiência para a sobrevivência de tais organismos. Apesar da aparente simplicidade do seu sistema defesa, os invertebrados

têm mantido sua presença no planeta através de milhões de anos de existência (Barbosa et al., 2006; Loker et al., 2001).

Acredita-se que as lectinas desempenhem o papel de reconhecimento de moléculas estranhas ao organismo do molusco (Horák & van der Knaap, 1997). Assim como ocorre nos vertebrados, a invasão por materiais estranhos no organismo produz uma resposta celular. Estudos utilizando moluscos límnicos e terrestres demonstraram a capacidade de reconhecimento e rejeição de transplantes através da encapsulação (Jourdane & Cheng, 1987; Yamaguchi et al., 1999). Desta forma, a mobilização dos mecanismos de defesa dos moluscos contra trematódeos parasitas pode ser considerada como uma reação normal, uma vez que estes parasitos são identificados como corpos estranhos, ou seja, não-próprios aos moluscos. Entretanto, alguns espécimes não são destruídos pelo sistema de defesa interno do molusco e podem usar seus hospedeiros como locais para nutrição, crescimento e reprodução (Trager, 1986; Sasaki et al., 2003).

Foi demonstrado que fatores celulares presentes na hemolinfa de *Oncomelania nosophora* diferiam no reconhecimento, aderência e fagocitose de materiais não-próprios pelos hemócitos, identificando-se a presença de dois tipos de hemócitos na hemolinfa circulante: células do tipo I (semelhante a macrófagos) e células do tipo II (semelhantes a linfócitos), confirmando as conclusões de Sminia & Barendsen (1980). Segundo estes autores, apenas um tipo de hemócitos, os amebócitos, estão presentes nos moluscos límnicos *Lymnaea stagnalis*, *Biomphalaria glabrata* e *Bulinus truncatus*. Estes amebócitos consistem em uma população de células heterogêneas morfológica e funcionalmente, abrangendo desde células arredondadas com características morfológicas de células jovens até a presença de células altamente fagocíticas com um sistema lisossomal proeminente. Sasaki et al., (2003) descrevem as células do tipo II como imaturas morfológica, que decrescem em número na hemolinfa, indicando que estas células têm a capacidade de desenvolver e se transformar em células do tipo I que são eficazes em fagocitose. As observações dos autores mostram que as células do tipo I presentes no molusco isolado resistente a *Schistosoma* foram capazes de reconhecer e fagocitar materiais estranhos, enquanto que no isolado suscetível, as células do tipo I foram capazes de reconhecer, mas não de fagocitar materiais estranhos. Este fato pode ser o primeiro passo no entendimento das diferenças existentes entre moluscos resistentes e suscetíveis a determinados

trematódeos. Após penetrar em um molusco potencial hospedeiro intermediário, a resposta inicial por hemócitos provavelmente envolve um movimento direcionado ao parasito. Uma vez que os hemócitos tenham sido recrutados para os arredores do parasito, o próximo passo é estabelecer contato com o tegumento dos parasitos. Nos moluscos suscetíveis, embora os hemócitos sejam encontrados próximos ao parasito, eles falham ao realizar o contato. Se um parasito é encapsulado, dentro de alguns dias a cápsula se dispersa e o desenvolvimento normal do parasito dá prosseguimento. Nos moluscos resistentes a morte do parasito é resultado de encapsulação realizada por hemócitos com características semelhantes a macrófagos (Sasaki et al., 2003).

## **1.4.2 – Aspectos histopatológicos:**

### **1.4.2.1 – O modelo *Biomphalaria* spp – *Schistosoma mansoni*.**

Reações histopatológicas em moluscos do gênero *Biomphalaria* após exposição a miracídios de *Schistosoma mansoni* tem auxiliado na compreensão do mecanismo envolvido na compatibilidade desse trematódeo e seu hospedeiro intermediário natural.

Vários níveis de reação tecidual têm sido observados em *Biomphalaria glabrata*, infectadas pelo *S. mansoni*, consistindo tanto de reações com proliferação hemocitária focal quanto difusa. A reação focal caracteriza-se pela encapsulação e formação de estruturas granulomatosas envolvendo remanescentes de esporocistos ou cercárias e limitadas perifericamente por laminações de finas fibras. Também tem sido constatada a presença dessas alterações nos tecidos próximos aos esporocistos em desenvolvimento (Souza et al., 1997).

Reações inflamatórias focais também têm sido demonstradas nos tecidos de alguns órgãos de *B. glabrata* após exposição a miracídios de *S. mansoni*, mesmo quando a infecção não atingiu o período patente. Reações semelhantes raramente foram observadas no ovoteste de *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria straminea*, sugerindo que o mecanismo de resistência à infecção siga processos de evolução diferente. (Borges et al., 1998).

Ainda de acordo com Borges et al. (1998), a proteção contra a invasão dos miracídios de *S. mansoni* pode ser determinada por pelo menos dois mecanismos. O primeiro atuando pela destruição direta das larvas logo após a sua penetração,

enquanto o segundo agiria através de uma cadeia de reações destrutiva quando os esporocistos já houvessem se disseminado através dos tecidos do molusco. Este segundo mecanismo observado em *B. glabrata*, foi raramente encontrado em *B. tenagophila* e *B. straminea*, ambas menos suscetíveis à infecção pelo *S. mansoni* que *B. glabrata* e que conseguiram eliminar os miracídios invasores com poucas alterações residuais.

Tem sido demonstrado que amebócitos (hemócitos) desempenham importante função na destruição dos esporocistos em moluscos resistentes sensibilizados assim como nos não sensibilizados. Além disso, moluscos sensibilizados produziram fatores humorais que também podem exercer influência na resistência à infecção por *S. mansoni*. A incapacidade de muitos esporocistos migrarem para os tecidos mais internos do molusco na ausência de amebócitos sustenta essa hipótese. Geralmente a reação é difusa e raramente focal com infiltração de amebócitos ao redor das formas multiplicativas do trematódeo (Borges et al., 2006).

#### **1.4.2.2- O modelo *Biomphalaria* spp – *Echinostoma* spp.**

O molusco *B. glabrata* também apresenta largo espectro de suscetibilidade a trematódeos equinostomatídeos (Kostadinova & Gibson, 2000) e representa o hospedeiro natural de *E. paraensei* (Lie & Basch, 1967). Por possuir ciclo biológico de fácil manutenção em condições de laboratório e por sua importância médica, os equinostomatídeos têm sido utilizados como modelo experimental (Fried, 2000).

Estudos histopatológicos empregando equinostomatídeos decorreram inicialmente de uma série de investigações utilizando *B. glabrata* naturalmente resistentes a *Echinostoma lindoense*. Moluscos expostos a *E. lindoense* foram capazes de produzir uma reação hemocitária ventricular focal em seguida à chegada dos esporocistos ao coração. Os amebócitos (hemócitos) se acumulavam ao redor de um ou mais esporocistos, encapsulando-os, e levando-os à morte e desintegração. As massas celulares acumuladas ao redor das larvas mostravam citoplasma vacuolizado e inclusão amarelo-acastanhada que consistiam de amebócitos degenerados e necrosados, que gradualmente desapareciam (Lie & Heyneman, 1975).

Moluscos re-expostos a *E. lindoense* mostraram maior eficiência na destruição das larvas depois destas chegarem ao coração, sendo a seqüência de reações

teciduais semelhantes às observadas após a primeira exposição. A reação tecidual não se mostrou restrita à localização dos esporocistos, pois acúmulos de amebócitos também foram observados nas artérias e sinos sanguíneos do órgão cefalopodal que não se encontravam diretamente em contato com os esporocistos (Lie & Heyneman, 1976a).

Lie et al. (1975) e Lie & Heyneman (1975, 1976a, 1976b), estudaram a variação individual da resistência dos moluscos à exposição por *E. lindoense* e constataram que moluscos extremamente resistentes, destruíam os esporocistos em sua maioria na região cefalopodal, algumas vezes logo abaixo do epitélio, enquanto em moluscos cuja resistência era menos evidente, muitos esporocistos foram encontrados em tecidos mais profundos antes de serem destruídos pelos amebócitos.

Períodos quiescentes dos esporocistos de *E. lindoense* são normalmente observados durante sua migração ao coração dos moluscos suscetíveis. Nos moluscos sensibilizados a capacidade de migração dos esporocistos é reduzida o que tem sugerido períodos normais de atraso ou descanso, permitindo aos amebócitos ativados tempo para se acumular próximo às larvas. Em decorrência, o envolvimento de fatores humorais no mecanismo de defesa do molusco tem sido considerado (Lie & Heyneman, 1976b).

## 2. OBJETIVO GERAL

Caracterizar a relação parasito-hospedeiro dos isolados dos moluscos *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria glabrata* ao trematódeo *Echinostoma paraensei*, empregando uma abordagem biológica e histopatológica.

### 2.1- Objetivos específicos

- Determinar a suscetibilidade dos dois isolados de *B. tenagophila* e do isolado de *B. glabrata* em relação a vários níveis de exposição ao trematódeo *Echinostoma paraensei*.
- Determinar as influências causadas pela infecção na sobrevivência, infectividade, fecundidade e fertilidade dos moluscos.
- Descrever as reações histopatológicas dos isolados do molusco *Biomphalaria tenagophila* no curso da infecção experimental por *Echinostoma paraensei*.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1- Obtenção dos moluscos.

Os moluscos *Biomphalaria tenagophila* isolado da reserva do Taim, do estado do Rio Grande do Sul e *Biomphalaria tenagophila* isolado do município de São José dos Campos, do estado de São Paulo, foram obtidos a partir de colônias mantidas pelo Laboratório de Referência em Esquistossomose e Malacologia do Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz.

Os exemplares de *Biomphalaria glabrata* isolado de Sumidouro, estado do Rio de Janeiro foram obtidos a partir da colônia mantida pelo Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios do Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz. Todos os exemplares utilizados no momento do estudo tinham entre três e cinco milímetros de diâmetro.

#### 3.2- Moluscos suscetíveis e resistentes.

Muitos estudos admitem que na relação molusco-trematódeo, o sucesso ou a falha na infecção parasitária do hospedeiro é resultado de uma complexa reação mútua entre os mecanismos de defesa do hospedeiro e as estratégias de infectividade do parasito. Desta forma, geralmente é considerado que uma infecção mal sucedida é reflexo do processo de resistência do hospedeiro, enquanto uma infecção bem sucedida é característica da suscetibilidade apresentada pelo molusco hospedeiro (Théron & Coustau, 2005).

De acordo com Coustau & Théron (2004), o termo resistência a parasitos ou a patógenos se refere à capacidade inerente dos organismos em prevenir o estabelecimento ou o desenvolvimento de uma determinada espécie ou cepa de parasito compatível, em oposição a organismos suscetíveis da mesma espécie. Segundo os autores, a resistência é hereditária e poderia resultar de modificações genéticas (ou epigenéticas) de qualquer característica constitutiva ou provocada (não necessariamente o sistema de defesa interno destes organismos).

A compatibilidade é uma característica do sistema parasito-hospedeiro onde a espécie do parasito é capaz de estabelecer a infecção e alcançar sua transmissão através de determinado hospedeiro (Coustau & Théron, 2004).



*Biomphalaria tenagophila* isolado da Reserva do Taim no Rio Grande do Sul, é uma população considerada como resistente à infecção por *Schistosoma mansoni*, uma vez que tem se mostrado resistente à infecção por diferentes linhagens deste parasito (Santos et al., 1979; Bezerra et al., 2003; Martins-Souza et al., 2003; Coelho et al., 2004; Rosa et al., 2004, 2005, 2006; Barbosa et al., 2006; Coelho & Bezerra, 2006; Pereira et al., 2008).

Por outro lado, *Biomphalaria tenagophila* isolado do município de São José dos Campos, SP é uma população que possui diferentes níveis de suscetibilidade à infecção por *S. mansoni*, dependendo da linhagem ou cepa do parasito, sendo mais suscetível à infecção pela linhagem de *S. mansoni* simpátrica (Paraense & Corrêa, 1981; Zanotti-Magalhães et al., 1991, 1997; Reis et al., 1995; Zuim et al., 2005).

*Biomphalaria glabrata* isolado do município de Sumidouro, é uma população considerada suscetível à infecção por *S. mansoni*, sendo responsável pela manutenção do ciclo biológico do parasito na localidade (Silva et al., 1992; Freire et al., 2003).

### **3.3- Manutenção do ciclo biológico de *Echinostoma paraensei*.**

O ciclo biológico de *Echinostoma paraensei* tem sido mantido no Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestre Reservatórios, utilizando *Biomphalaria glabrata* proveniente do município de Sumidouro, Rio de Janeiro, como primeiro e segundo hospedeiros intermediários, e o hamster dourado *Mesocricetus auratus* como hospedeiro definitivo. O trematódeo foi isolado a partir de *Nectomys squamipes* naturalmente infectado, coletado no município de Capitão Andrade, estado de Minas Gerais (Lie & Basch, 1967; Maldonado Jr. et al., 2001a).

Os vermes adultos foram recuperados do intestino delgado de *M. auratus* após quatro semanas de infecção e colocados em placa de Petri contendo água desclorada. Os helmintos foram então dissecados com auxílio de estilete para obtenção de ovos uterinos. Estes foram colocados em frascos de cultura de células de 50 ml contendo água desclorada e mantidos a 28°C pelo período de quinze dias (Maldonado Jr. et al., 2001a).

Após este período, os ovos foram colocados em uma câmara de eclosão miracidiana contendo solução de água desclorada e expostos à luz (60 Watts) pelo

período de duas horas para a eclosão e recuperação dos miracídios (Maldonado Jr. et al., 2001b).

### 3.4- Avaliação da suscetibilidade à infecção por *E. paraensei*.

A tabela a seguir ilustra o delineamento experimental para as observações realizadas neste trabalho (Tabela 3.1).

**Tabela 3.1. Delineamento experimental realizado para as análises biológicas dos moluscos neste trabalho.**

<b>Espécie</b>	<b>Número de moluscos</b>	<b>Número de miracídios utilizados na exposição de cada molusco</b>
<i>Biomphalaria tenagophila</i> (Taim)	10	10
	10	25
	10	50
	10	100
	10	Controle não exposto
<i>Biomphalaria glabrata</i> (Sumidouro)	10	10
	10	25
	10	50
	10	100
	10	Controle não exposto
<i>Biomphalaria tenagophila</i> (São José dos Campos)	10	10
	10	25
	10	50
	10	100
	10	Controle não exposto

Os espécimes foram expostos individualmente aos miracídios em placas de cultura de células de 24 poços com três mililitros de água desclorada e mantidos até o dia seguinte (Saap & Loker, 2000).

Todos os exemplares foram individualmente identificados e mantidos em recipientes com 250 ml de água desclorada, contendo argila esterilizada e alimentados com alface (*Lactuca sativa*), *ad libitum* (Costa et al., 2004). Os recipientes possuíam tampas contendo pequenas perfurações que permitiam as trocas gasosas. Os mesmos foram mantidos em luminosidade e temperatura ambiente. Todos os moluscos foram

submetidos às mesmas condições exceto os grupos controles que não foram expostos a miracídios.

Para a análise da relação entre o número de miracídios utilizados para a infecção e o número de cercárias eliminadas, os moluscos foram expostos em placa de Petri a uma fonte luminosa (lâmpada de 60 watts) por três horas, após esse período, as cercárias eram mortas pela adição de álcool contendo iodo a 0.1% e quantificadas com o auxílio de microscópio estereoscópico (Maldonado Jr. et al., 2001b).

A observação da eliminação de cercárias ocorreu a partir da terceira semana após a exposição aos miracídios, baseado no conhecimento do ciclo biológico do *E. paraensei*. O número de cercárias eliminadas por cada molusco foi observado uma vez por semana, a partir do qual foi calculada a média semanal de eliminação (Maldonado Jr. et al., 2001b).

Os cálculos estatísticos para a avaliação da eliminação de cercárias segundo os números (doses) de miracídios utilizados foram realizados através da análise One-way (ANOVA) do programa STATISTICA versão 7.0 e observados em maior detalhe pelo teste à posterior de Tukey HSD.

### **3.5- Avaliação da taxa de mortalidade, fecundidade e fertilidade dos moluscos após exposição a miracídios de *E. paraensei*.**

Durante nove semanas a partir da data de exposição dos moluscos aos miracídios a taxa de mortalidade foi mensurada semanalmente.

Para a análise da mortalidade foi considerado o número de moluscos mortos em relação ao número total de moluscos vivos no início do experimento (Muñoz-Antoli et al., 2007) . A mortalidade dos moluscos era observada mediante a ausência de sinais vitais, como movimento e capacidade de reagir a estímulos através da contração das partes moles.

Para a análise da fecundidade foram considerados o número de desovas produzidas por cada molusco semanalmente e o de ovos contidos em cada desova. A partir destes dados, a média e o desvio padrão do número de desovas e dos ovos produzidos pelos moluscos foram calculados (Costa et al., 2004; Muñoz-Antoli et al., 2007).

Para tal, as desovas foram coletadas a partir de placas de isopor mantidas no recipiente e das paredes do próprio recipiente de plástico com uma espátula confeccionada em aço inox, que permitiu a recuperação total das desovas (Cooper et al., 1994). Após a retirada, as mesmas foram colocadas em placas de Petri descartáveis, individualizadas, contendo seis mililitros de água desclorada para evitar o ressecamento, e contadas sob microscópio estereoscópico utilizando-se contador manual como realizado por Kawazoe (1976).

Na análise da fertilidade, foi considerado o número de ovos férteis presentes em cada desova produzida pelos moluscos. Os números de média e desvio padrão dos números totais de ovos férteis contidos em cada desova foram calculados (Kawazoe, 1977; Costa et al., 2004).

Os cálculos estatísticos para a avaliação da fecundidade e fertilidade foram realizados através da análise de variância de medidas repetidas (ANOVA) do programa STATISTICA versão 7.0 e observados em maior detalhe pelo teste à posterior de Tukey HSD.

### **3.6- Estudo histopatológico dos isolados do molusco *Biomphalaria tenagophila* infectados.**

No intuito de observar a relação parasito-hospedeiro na fase intramolusco do parasito, foram realizados e analisados cortes histológicos dos moluscos *Biomphalaria tenagophila* dos isolados do Taim e de São José dos Campos em determinados períodos após a exposição em massa aos miracídios do parasito.

A tabela a seguir ilustra o delineamento experimental da análise histopatológica dos moluscos (Tabela 3.2).

**Tabela 3.2. Delineamento experimental realizado para a análise histopatológica dos moluscos neste trabalho.**

<b>Espécie</b>	<b>Número de moluscos de cada isolado sacrificados</b>	<b>Período após a exposição</b>
<i>Biomphalaria tenagophila</i> (Taim) e <i>Biomphalaria tenagophila</i> (São José dos Campos)	5 expostos 3 controles não expostos	6 horas
	5 expostos 3 controles não expostos	12 horas
	5 expostos 3 controles não expostos	24 horas
	5 expostos 3 controles não expostos	48 horas
	5 expostos 3 controles não expostos	5 dias
	5 expostos 3 controles não expostos	10 dias
	5 expostos 3 controles não expostos	15 dias
	5 expostos 3 controles não expostos	20 dias
	5 expostos 3 controles não expostos	25 dias
	5 expostos 3 controles não expostos	30 dias
5 expostos 3 controles não expostos	35 dias	

Parte dos moluscos foi sacrificada por esmagamento da concha nos períodos de 6 e 12 horas após a exposição (Boaventura, 2002). Os demais foram anestesiados pelo período de 6 horas utilizando solução de Hypnol a 0,5% (Thiengo, 2006), removidos da concha com o auxílio de pinças oftálmicas e toda a parte mole foi fixada em solução de Millonig (Carson et al. 1973). O material fixado foi desidratado em série alcoólica

crescente, clarificado em xilol, embebidos em parafina, seccionados (5 micrômetros de espessura) e corados com hematoxilina/eosina (Souza & Andrade, 2006; Borges, 2005).

Os cortes foram analisados utilizando o microscópio óptico marca Zeiss Axioscop 2 (Alemanha) e as imagens foram capturadas através do sistema de câmera acoplada JVC TK-128OU (Japão) utilizando o software Axiovision 2.0 Zeiss (Souza, 2006).

As regiões selecionadas para análise foram: o saco pericárdico, a porção sacular e tubular do rim, as glândulas digestivas e o ovoteste. As reações teciduais examinadas foram definidas segundo Borges (2005) como: difusa (consistindo de proliferação de hemócitos através dos espaços intersticiais dos órgãos estudados) e focal (consistindo de proliferação de hemócitos em torno dos parasitos formando estruturas concêntricas frouxas).

## 4. RESULTADOS

### 4.1- Estudo da Interação *Biomphalaria* spp.-*Echinostoma paraensei*

#### 4.1.1- Mortalidade

Os moluscos *Biomphalaria tenagophila* isolado da Reserva do Taim, RS (Taim), resistentes à infecção por *Schistosoma mansoni*, não apresentaram mortalidade para os grupos de miracídios testados, com exceção do grupo exposto a 50 miracídios o qual apresentou taxa de 20% de mortalidade. A taxa de sobrevivência também não se alterou considerando-se o tempo após a exposição, tanto para os moluscos que eliminaram cercárias, quanto para os expostos aos miracídios que não eliminaram cercárias. O grupo controle não exposto a miracídios manteve alta a taxa de sobrevivência (100%) durante todo o período de observação (Tabela 4.1)

Entretanto, em *Biomphalaria glabrata* isolado do município de Sumidouro, RJ (SU), suscetível à infecção por *S. mansoni*, observou-se mortalidade, apesar de não ter sido verificado relação com as diferentes quantidades de miracídios a que esses moluscos foram expostos. Observou-se que a mortalidade foi variável e oscilou entre 10 e 60%, e que essa foi aumentando com o decorrer do tempo após a exposição para os moluscos infectados. Foi observado que parte dos moluscos morreram antes de eliminar cercárias ainda no período pré-patente da infecção, enquanto nos moluscos que eliminaram cercárias, a mortalidade ocorreu no decorrer do período patente da infecção. Para o grupo controle não exposto aos miracídios, a taxa de sobrevivência foi de 90% (Tabela 4.2).

Diferentemente das duas espécies anteriormente relatadas, em *Biomphalaria tenagophila* isolado do município de São José dos Campos, SP (SJC), suscetível à infecção por *S. mansoni*, a taxa de mortalidade mostrou-se relacionada ao número de miracídios utilizados para a infecção, sendo que a mesma variou de 20 a 100% para os grupos expostos a 10, 25, 50 e 100 miracídios, respectivamente. Além disso, foi observado que a mortalidade foi mais elevada no período patente da infecção. Constatou-se ainda que houve mortalidade tanto nos indivíduos eliminando cercárias assim como nos expostos a miracídios e que não eliminaram cercárias. A taxa de

sobrevivência manteve-se alta (90%) para o grupo controle não exposto aos miracídios durante o período de observação (Tabela 4.3).

#### 4.1.2- Infectividade

Considerando o sucesso da infecção como a capacidade dos moluscos de eliminar cercárias, verificou-se que *B. tenagophila* (Taim), resistente à infecção por *Schistosoma mansoni*, mostrou-se suscetível à infecção por *Echinostoma paraensei*, onde a eliminação de cercárias foi mantida por todo o período patente da infecção. A infectividade mostrou uma tendência a estar relacionada ao número de miracídios a que os moluscos foram expostos, ou seja, quanto maior o número de miracídios a que os moluscos foram expostos, maior o número de moluscos infectados (Tabela 4.4). A taxa de infecção variou de 20 a 60% para os grupos expostos a 25, 50 e 100 miracídios respectivamente. No grupo exposto a 10 miracídios não houve moluscos eliminando cercárias. A variação do número de cercárias eliminadas foi estatisticamente significativa entre os grupos expostos a 25 e a 50 miracídios. (Tabelas 4.4 e 4.18).

*B. glabrata* (SU), suscetível à infecção por *S. mansoni*, também se mostrou suscetível à infecção, tendo a eliminação de cercárias ocorrido por todo o período patente da infecção com valores absolutos crescentes. A infectividade foi dependente do número de miracídios utilizados para a infecção dos moluscos. A taxa de infecção variou entre 50 e 90% para os grupos expostos. Enquanto nos grupos expostos a 10, 25 e 50 miracídios observou-se uma relação entre o número de miracídios e taxa de infecção, para o grupo exposto a 100 miracídios a mesma relação não foi constatada. Além disso, o número de miracídios aos quais os grupos foram expostos pareceu não influenciar no número de cercárias eliminadas pelos moluscos (Tabelas 4.5 e 4.18).

*B. tenagophila* (SJC), suscetível à infecção por *S. mansoni*, mostrou-se a menos suscetível entre as espécies estudadas, com moluscos eliminando cercárias apenas nos grupos expostos a 50 e a 100 miracídios. A eliminação de cercárias ocorreu apenas na 4ª semana para o grupo exposto a 50 miracídios e, particularmente, na 3ª semana para o grupo exposto a 100 miracídios. Apenas 10 % dos moluscos dos grupos expostos a 50 e a 100 miracídios eliminaram cercárias, não havendo moluscos eliminando cercárias nos grupos expostos a 10 e 25 miracídios, sugerindo que a infectividade foi dependente do número de miracídios aos quais os moluscos foram



expostos. O baixo número de moluscos expostos eliminando cercárias, e a alta mortalidade impediram inferências estatísticas para *B. tenagophila* (SJC) (Tabelas 4.3 e 4.6).

#### **4.1.3- Fecundidade e fertilidade**

Ao analisar a fecundidade (número de desovas e número de ovos) e a fertilidade (número de ovos férteis) em *B. tenagophila* (Taim), resistente à infecção por *Schistosoma mansoni*, foi observada uma significativa diferença ocorrendo entre os períodos pré-patente e patente da infecção, onde no período pré-patente os moluscos são menos fecundos e menos férteis em relação ao período patente devido ao desenvolvimento da maturidade sexual não se distinguindo do grupo controle não exposto aos miracídios de *Echinostoma paraensei*. Além disso, observa-se um aumento da fecundidade e da fertilidade no decorrer do período de observação nos moluscos expostos que não eliminaram cercárias e nos moluscos pertencentes ao grupo controle não exposto. Diferentemente, ocorre uma diminuição da fecundidade e da fertilidade no decorrer do período de observação nos moluscos expostos que eliminaram cercárias. Foi constatada também uma significativa diferença na fecundidade e fertilidade entre os moluscos que eliminaram cercárias, que não eliminaram cercárias e pertencentes ao grupo controle não exposto, onde os moluscos expostos a 10, 25, 50 e 100 miracídios que não eliminaram cercárias tiveram um padrão de fecundidade e fertilidade similar ao dos moluscos pertencentes ao grupo controle não exposto. Por outro lado, os moluscos expostos a 25, 50 e 100 miracídios que eliminaram cercárias apresentaram valores para fecundidade e fertilidade menores que os grupos expostos que não eliminaram cercárias e o grupo controle não exposto a miracídios. Não foi observada diferença na fecundidade e na fertilidade em relação à quantidade de miracídios utilizados na exposição dos moluscos (Tabelas 4.7, 4.8, 4.9, 4.16, 4.17 e 4.18).

Em *B. glabrata* (SU), suscetível à infecção por *S. mansoni*, também foi observada uma diferença estatisticamente significativa na fecundidade e na fertilidade entre os períodos pré-patente e patente da infecção, uma vez que a maturação sexual dos moluscos no período patente é maior que no período pré-patente como ocorre nos moluscos pertencentes ao grupo controle não exposto aos miracídios de *E. paraensei*. Assim como na espécie anterior, um aumento da fecundidade e da fertilidade no

decorrer do período de observação nos moluscos expostos que não eliminaram cercárias e nos moluscos pertencentes ao grupo controle não exposto foi observado. Por outro lado, os moluscos expostos que eliminaram cercárias, a fecundidade e a fertilidade decresceram no decorrer do período de observação, constatando-se uma redução a zero em desovas postas pelos moluscos expostos a 10 e a 50 miracídios. Tal fato também pôde ser constatado nos moluscos expostos a 50 miracídios que não eliminaram cercárias. Nos moluscos expostos a 25 e 100 miracídios que eliminaram cercárias, a redução da fecundidade e da fertilidade foi gradual no decorrer do período de observação. Significante diferença na fecundidade e fertilidade entre os moluscos que eliminaram cercárias, que não eliminaram cercárias e pertencentes ao grupo controle não exposto foi observada, onde os moluscos expostos a 10, 50 e 100 miracídios que não eliminaram cercárias tiveram um padrão de fecundidade e fertilidade similar ao dos moluscos pertencentes ao do grupo controle não exposto, enquanto nos moluscos expostos a 10, 25, 50 e 100 miracídios que eliminaram cercárias apresentaram fecundidade e fertilidade menores que os grupos expostos que não eliminaram cercárias e o grupo controle não exposto a miracídios. Não foi observada diferença na fecundidade e na fertilidade quando relacionados à quantidade de miracídios utilizados na exposição dos moluscos (Tabelas 4.10, 4.11, 4.12, 4.16, 4.17 e 4.18).

Para *B. tenagophila* (SJC), suscetível à infecção por *S. mansoni*, não houve diferença na fecundidade e na fertilidade entre os períodos pré-patente e patente dos moluscos expostos a 10, 25, 50 e 100 miracídios. Esta diferença pôde ser observada nos moluscos expostos onde devido à infecção houve uma antecipação em duas semanas da maturidade sexual em relação ao grupo controle não exposto a miracídios. Nos moluscos expostos que não eliminaram cercárias, a fecundidade e a fertilidade foram maiores que nos moluscos do grupo controle não exposto a miracídios. Por apresentarem um período fecundo e fértil curto devido à mortalidade e uma taxa de infectividade muito baixa, não foi possível realizar comparações entre os moluscos expostos que eliminaram cercárias e os demais grupos. Foi constatado também que os moluscos expostos a 50 miracídios que não eliminaram cercárias, possuem fecundidade e fertilidade menor em relação aos moluscos expostos a 10, 25 e 100 miracídios que não eliminaram cercárias. Não foi observada diferença na fecundidade e

na fertilidade em relação à quantidade de miracídios utilizados na exposição dos moluscos (Tabelas 4.13, 4.14, 4.15, 4.16 e 4.17).

#### **4.2- Análise histopatológica**

A análise dos cortes histológicos dos moluscos *B. tenagophila* (Taim), resistentes à infecção por *S. mansoni*, com trinta dias de infecção, realizada através da microscopia óptica revelou um acúmulo de formas parasitárias de *E. paraensei* no saco pericárdico e ausência de reações ou focos proliferativos de hemócitos no local ou nas proximidades (Figuras 4.1 e 4.2). O saco pericárdico sofre um aumento em seu tamanho devido ao elevado número de formas parasitárias acumuladas. Porém nenhuma reação foi observada (Figura 4.2). Algumas formas parasitárias foram observadas na glândula digestiva, entretanto, reações ou proliferações de hemócitos na região não foram observadas (Figura 4.3). Na região do ovoteste, observa-se um acúmulo de formas parasitárias ocasionando destruição parcial do tecido, além de remanescentes destruídos de células da própria região, acompanhadas por proliferação focal de hemócitos encapsulando tais formas parasitárias (Figura 4.4). Não foram encontradas formas parasitárias na porção sacular dos rins deste hospedeiro.

*B. tenagophila* (SJC), suscetível à infecção por *S. mansoni*, com trinta dias de infecção, apresentou pequenas quantidades de hemócitos na cavidade cardíaca mesmo na ausência de formas parasitárias (Figura 4.5). Na região próxima aos túbulos renais, hemócitos foram localizados ao redor do parasito encapsulando-o (reação focal) (Figuras 4.6 e 4.7). Nos túbulos renais houve alteração das células do tecido original devido à exacerbada resposta inflamatória contra o parasito. Tal alteração corresponde ao que é denominado como fibrose nos vertebrados. Alguns infiltrados de hemócitos podem ser observados próximos ao parasito como se estivessem sendo recrutados para o local (Figura 4.8). Na região do ovoteste, apenas algumas células que compõem o tecido original puderam ser observadas (Figuras 4.9 e 4.10). Neste tecido, alguns infiltrados inflamatórios foram observados, porém nenhuma forma parasitária foi encontrada (Figura 4.10). Foi observada neste hospedeiro, tanto reação do tipo difusa quanto focal, tendo ocorrido reação do tipo difusa no coração, nos túbulos renais e no ovoteste (Figuras 4.5, 4.8 e 4.10), enquanto a focal ocorreu na região próxima aos túbulos renais (Figuras 4.6 e 4.7). Não foram observadas formas parasitárias nem reações nos demais tecidos analisados neste hospedeiro.

Da mesma forma, não foram observadas formas parasitárias em desenvolvimento e proliferações de hemócitos nos tecidos de *B. tenagophila* (Taim) e *B. tenagophila* (SJC) nos períodos de 6, 12, 24 e 48 horas, 5, 10, 15, 20, 25 e 35 dias após a exposição aos miracídios.

**Tabela 4.1 - Mortalidade semanal de *Biomphalaria tenagophila* isolado da Reserva do Taim, RS após a exposição a 10, 25, 50 ou 100 miracídios de *Echinostoma paraensei*; MNEC - moluscos não eliminando cercárias; MEC - moluscos eliminando cercárias; MNE - moluscos não expostos (Número de moluscos).**

Espécie	Número de miracídios		Semanas após a exposição								
			1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Biomphalaria tenagophila</i>	10	MNEC (10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		MEC (0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	25	MNEC (8)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		MEC (2)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	50	MNEC (7)	0	2	0	0	0	0	0	0	0
		MEC (3)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	MNEC (1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		MEC (9)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Controle	MNE (10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**Tabela 4.2 – Mortalidade semanal de *Biomphalaria glabrata* isolado do município de Sumidouro, RJ após a exposição a 10, 25, 50 ou 100 miracídios de *Echinostoma paraensei*; MNEC - moluscos não eliminando cercárias; MEC - moluscos eliminando cercárias; MNE - moluscos não expostos (Número de moluscos).**

Espécie	Número de miracídios		Semanas após a exposição								
			1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Biomphalaria glabrata</i>	10	MNEC (5)	0	3	0	0	0	0	0	0	0
		MEC (5)	0	0	0	0	0	1	1	0	0
	25	MNEC (2)	0	2	-	-	-	-	-	-	-
		MEC (8)	0	0	0	0	0	1	0	0	2
	50	MNEC (1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		MEC (9)	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	100	MNEC (5)	0	3	2	-	-	-	-	-	-
		MEC (5)	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	Controle	MNE (10)	0	1	0	0	0	0	0	0	0

**Tabela 4.3 - Mortalidade semanal de *Biomphalaria tenagophila* isolado do município de São José dos Campos, SP após a exposição a 10, 25, 50 ou 100 miracídios de *Echinostoma paraensei*; MNEC - moluscos não eliminando cercárias; MEC - moluscos eliminando cercárias; MNE - moluscos não expostos (Número de moluscos); (-) = Não há moluscos vivos.**

Espécie	Número de miracídios		Semanas após a exposição									
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	
<i>Biomphalaria tenagophila</i>	10	MNEC (10)	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
		MEC (0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	25	MNEC (10)	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
		MEC (0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	50	MNEC (9)	0	1	0	3	1	4	-	-	-	-
		MEC (1)	0	0	0	0	1	-	-	-	-	-
	100	MNEC (9)	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0
		MEC (1)	0	0	0	1	-	-	-	-	-	-
	Controle	MNE (10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

**Tabela 4.4 - Infectividade e média semanal de cercárias eliminadas por *Biomphalaria tenagophila* isolado da Reserva do Taim, RS após a exposição a 10, 25, 50 ou 100 miracídios de *Echinostoma paraensei*.**

Espécie	Número de miracídios	Número total e (%) de moluscos positivos	Semanas após a exposição						
			3	4	5	6	7	8	9
<i>Biomphalaria tenagophila</i>	10	10 (0)	0	0	0	0	0	0	0
	25	10 (20)	0	37±0	0	85±59,4	163±5,6	131,5±21,9	477,5±174,6
	50	10 (30)	0	8,7±5	36,5±36,1	71,7±47	66,3±44,6	100,3±52,3	161,3±15,9
	100	10 (60)	0	16±15	31,5±44,9	70,6±28,7	70,3±37,9	138,7±47,2	309,2±122,5



**Tabela 4.5 - Infectividade e média semanal de cercárias eliminadas por *Biomphalaria glabrata* isolado do município de Sumidouro, RJ após a exposição a 10, 25, 50 ou 100 miracídios de *Echinostoma paraensei*.**

Espécie	Número de miracídios	Número total e (%) de moluscos positivos	Semanas após a exposição						
			3	4	5	6	7	8	9
<i>Biomphalaria glabrata</i>	10	10 (50)	0	122,8±100,3	188,2±73,6	308±112,7	246±115,3	262,7±255	185±126,1
	25	10 (80)	0	93,6±89,1	105,4±75,1	247,1±125,5	396,3±349,3	184±101,2	332±299,2
	50	10 (90)	0	59,9±60,3	99±70	240,9±152,4	262,9±160,4	205±155,1	339,6±233,7
	100	10 (50)	0	7±0	33,8±14,2	170,2±110,7	184,4±143,3	114,8±73,7	274±172,8

**Tabela 4.6 - Infectividade e média semanal de cercárias eliminadas por *Biomphalaria tenagophila* isolado do município de São José dos Campos, SP após a exposição a 10, 25, 50 ou 100 miracídeos de *Echinostoma paraensei*.**

Espécie	Número de miracídeos	Número total e (%) de moluscos positivos	Semanas após a exposição						
			3	4	5	6	7	8	9
<i>Biomphalaria tenagophila</i>	10	10 (0)	0	0	0	0	0	0	0
	25	10 (0)	0	0	0	0	0	0	0
	50	10 (10)	0	38±0	0	0	0	0	0
	100	10 (10)	23±0	0	0	0	0	0	0

**Tabela 4.7 - Média semanal de desovas de *Biomphalaria tenagophila* isolado da Reserva do Taim, RS após a exposição a 10, 25, 50 ou 100 miracídios de *Echinostoma paraensei*; MNEC - moluscos não eliminando cercárias; MEC - moluscos eliminando cercárias; MNE - moluscos não expostos.**

Espécie	Número de miracídios		Semanas após a exposição								
			1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Biomphalaria tenagophila</i>	10	MNEC	0	4,8±1,7	2,3±0,8	4,7±2	2,6±1,3	5,1±2,3	3,5±1,8	4±2,5	3,9±1
		MEC	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	25	MNEC	0	1±0	2,8±2,1	2,5±1,4	3,4±2,1	3,7±2,4	6,4±1,8	7,6±2,3	3,6±1,4
		MEC	0	0	4,5±0,7	3,5±0,7	3±2,8	3±1,4	6,5±0,7	2±1,4	2±0
	50	MNEC	0	0	5±1,7	4,7±1,9	4±1,2	3±1,6	6,6±2,4	8±3,1	6,2±3,3
		MEC	0	12±0	4,7±2,5	6±2	2,3±2,3	2,3±0,6	5,5±3,5	5,5±0,7	1±0
	100	MNEC	0	5±0	3±1,6	5,7±0,6	6±0	5±0	9±0	6±0	4±0
		MEC	0	1±0	6±0	5,3±1,5	5,4±2,2	2±0	3,5±3	6±0	1,4±0,9
	Controle	MNE	0	0	2±1,4	3,7±1,6	4,7±2,4	3,8±2,3	6,8±2,3	6,5±4,1	3,3±1,3

**Tabela 4.8 - Média semanal de ovos por desova de *Biomphalaria tenagophila* isolado da Reserva do Taim, RS após a exposição a 10, 25, 50 ou 100 miracídeos *Echinostoma paraensei*; MNEC - moluscos não eliminando cercárias; MEC - moluscos eliminando cercárias; MNE - moluscos não expostos.**

Espécie	Número de miracídeos		Semanas após a exposição								
			1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Biomphalaria tenagophila</i>	10	MNEC	0	14,1±6,9	9,4±6,4	15,9±9,3	13,9±8,2	15,8±10,6	19,3±8,7	15,6±8,5	20,5±11,2
		MEC	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	25	MNEC	0	6±0	9,8±5,5	10,7±5,9	11,7±4,6	11,5±6,6	19,4±11	19,4±11,7	20,2±10,1
		MEC	0	0	14,1±4,7	12,1±9	4,8±2,5	3,3±1,5	2,4±1,4	1,3±0,6	1±0
	50	MNEC	0	0	12±6,8	9,5±6	8,8±5	7,1±5,5	16,1±11,7	14,1±10	18,8±12,7
		MEC	0	5,3±2,6	6,5±3,3	3,1±3,5	1,4±0,5	1±0	1,2±0,4	1,6±1,1	1±0
	100	MNEC	0	5,8±1,9	6,7±3,4	8,7±2,8	14±3,2	15,6±4,4	22,1±8,1	21,3±10,5	8,2±2,9
		MEC	0	4±0	7±0	2,9±2,1	4,9±3,1	2,6±2,5	3,4±2,6	2±0,6	1,2±0,5
	Controle	MNE	0	0	9±6,2	12,5±9,1	11±8,9	10,2±7,4	11,8±8,4	16±9,6	17,3±11,1

**Tabela 4.9 - Média semanal de ovos férteis por desova de *Biomphalaria tenagophila* isolado da Reserva do Taim, RS após a exposição a 10, 25, 50 ou 100 miracídios de *Echinostoma paraensei*; MNEC - moluscos não eliminando cercárias; MEC - moluscos eliminando cercárias; MNE - moluscos não expostos.**

Espécie	Número de miracídios		Semanas após a exposição								
			1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Biomphalaria tenagophila</i>	10	MNEC	0	11,5±6,4	7,4±6,2	13,3±9,8	14,1±8,4	13,8±12,1	18,2±9,1	13,9±8,1	18±12
		MEC	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	25	MNEC	0	3±0	7,9±4,8	11,1±6,9	8±5,3	6,4±3,5	16,6±10,5	17,8±11,7	19,9±10,1
		MEC	0	0	11,3±4,7	11,3±9,8	4,2±2,3	2,3±1,4	1,8±0,9	1,5±0,7	1±0
	50	MNEC	0	0	9,1±5,8	6±5,8	7,4±5	4,8±4,2	15,8±11,5	12,3±9,6	18,8±12,7
		MEC	0	2,1±1,6	5,7±3,3	3,5±3,7	1,2±0,4	1±0	1,2±0,5	1,2±0,4	1±0
	100	MNEC	0	3,6±1,7	5,7±2,8	5,4±3,2	11,8±4,3	12,4±5,3	19±10,4	20±10,6	8,2±2,9
		MEC	0	3±0	5,3±0	1,5±0,7	3,2±2,4	1,8±1,3	3,2±2,3	1,8±0,8	1,2±0,5
	Controle	MNE	0	0	7,5±5,2	11,9±6,1	10,7±9,6	7,4±6,9	11,5±8,5	14,6±9,7	17,3±11,1

**Tabela 4.10 - Média semanal de desovas de *Biomphalaria glabrata* isolado do município de Sumidouro, RJ após a exposição a 10, 25, 50 ou 100 miracídeos de *Echinostoma paraensei*; MNEC - moluscos não eliminando cercárias; MEC - moluscos eliminando cercárias; MNE - moluscos não expostos; (-) = Não há moluscos vivos.**

Espécie	Número de miracídeos		Semanas após a exposição								
			1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Biomphalaria glabrata</i>	10	MNEC	0	0	0	4±0	8,5±2,1	5±0	0	8±4,2	11±0
		MEC	0	0	5,3±4	6,7±3,5	1,5±0,7	1±0	0	0	0
	25	MNEC	0	-	-	-	-	-	-	-	-
		MEC	0	0	5,5±3,5	5,7±2,3	2±1	3±0	2±1,4	2±0	11±0
	50	MNEC	0	0	4±0	12±0	7±0	3±0	0	8±0	0
		MEC	0	0	2±0	0	1±0	0	0	0	0
	100	MNEC	0	0	-	-	-	-	-	-	-
		MEC	0	0	3,3±2,5	8±2,6	3,5±3,8	2±1,7	4,7±0,6	1,5±0,7	3±1,7
	Controle	MNE	0	0	6±2,2	5,1±2,5	5,9±4,1	4,2±2	4,5±2,4	8±2,3	10,1±2,9

**Tabela 4.11 - Média semanal de ovos por desova de *Biomphalaria glabrata* isolado do município de Sumidouro, RJ após a exposição a 10, 25, 50 ou 100 miracídeos de *Echinostoma paraensei*; MNEC - moluscos não eliminando cercárias; MEC - moluscos eliminando cercárias; MNE - moluscos não expostos; (-) = Não há moluscos vivos.**

Espécie	Número de miracídeos		Semanas após a exposição								
			1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Biomphalaria glabrata</i>	10	MNEC	0	0	0	8,7±3,9	25±16,2	29±5,9	0	11,9±9,5	6,3±4,4
		MEC	0	0	13,7±8,3	7,7±6,3	2±0	1±0	0	0	0
	25	MNEC	0	-	-	-	-	-	-	-	-
		MEC	0	0	3,2±2,9	3,3±2,3	10,4±10,8	9,7±4,9	7,7±4,7	8,5±6,4	4,4±1,6
	50	MNEC	0	0	12±5,7	10,7±3,9	23,7±13,3	8±6	0	17,6±6,3	0
		MEC	0	0	1±0	0	1±0	0	0	0	0
	100	MNEC	0	0	-	-	-	-	-	-	-
		MEC	0	0	6,2±2,8	6,4±6,6	8,1±4,6	1,7±0,8	3,4±2,1	1,7±1,1	2,3±1,3
	Controle	MNE	0	0	15,3±8,1	18,7±12,6	24,1±10,9	19,5±9,4	14,5±6,9	12,8±7,4	16,8±8,4

**Tabela 4.12 - Média semanal de ovos férteis por desova de *Biomphalaria glabrata* isolado do município de Sumidouro, RJ após a exposição a 10, 25, 50 ou 100 miracídios de *Echinostoma paraensei*; MNEC - moluscos não eliminando cercárias; MEC - moluscos eliminando cercárias; MNE - moluscos não expostos; (-) = Não há moluscos vivos.**

Espécie	Número de miracídios		Semanas após a exposição								
			1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Biomphalaria glabrata</i>	10	MNEC	0	0	0	7,7±3,9	24,2±16,2	28,4±6,2	0	11,5±9,5	4,6±2,5
		MEC	0	0	14,1±7,8	6,9±6	2±0	0	0	0	0
	25	MNEC	0	-	-	-	-	-	-	-	-
		MEC	0	0	2±1,5	2±1,5	10,2±11	9,7±4,9	4,2±2,4	3±2,8	1,8±0,9
	50	MNEC	0	0	10,7±6,2	10,5±4	19,6±9,5	7,7±6	0	16,4±7,5	0
		MEC	0	0	1±0	0	1±0	0	0	0	0
	100	MNEC	0	0	-	-	-	-	-	-	-
		MEC	0	0	4,7±2,3	6,8±6,9	7,7±4,9	1,5±0,8	3,3±2,2	1,7±1,1	1,6±0,8
	Controle	MNE	0	0	13,2±7,6	18±12,3	23,7±10,9	18,8±9,5	14±7,2	12,2±7,5	15,7±8,5



**Tabela 4.13 - Média semanal de desovas de *Biomphalaria tenagophila* isolado do município de São José dos Campos, SP após a exposição a 10, 25, 50 ou 100 miracídios de *Echinostoma paraensei*; MNEC - moluscos não eliminando cercárias; MEC - moluscos eliminando cercárias; MNE - moluscos não expostos; (-) = Não há moluscos vivos.**

Espécie	Número de miracídios		Semanas após a exposição								
			1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Biomphalaria tenagophila</i>	10	MNEC	0	7,2±4,1	7±3,4	6,8±4,4	5,5±2,1	8±6,2	5,4±2,5	6±4,3	5,2±3,4
		MEC	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	25	MNEC	0	7,5±3,8	9,2±5	5,2±3,5	5,9±3,3	9±2,5	6,7±3,4	7,9±2,5	6,4±2,4
		MEC	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	50	MNEC	0	6,9±3,6	6,7±2,2	4,8±1,1	4,3±3	-	-	-	-
		MEC	0	4±0	6±0	7±0	-	-	-	-	-
	100	MNEC	0	8,4±5,4	7,9±3,7	5±4,3	4,4±1,1	7±2,1	3,6±1,5	3,5±1,3	2,6±1,3
		MEC	0	6±0	11±0	-	-	-	-	-	-
	Controle	MNE	0	0	0	8±3,6	2±1,4	3,4±1,1	2±1	3,4±1,5	4,4±2,6

**Tabela 4.14 - Média semanal de ovos por desova de *Biomphalaria tenagophila* isolado do município de São José dos Campos, SP após a exposição a 10, 25, 50 ou 100 miracídeos de *Echinostoma paraensei*; MNEC - moluscos não eliminando cercárias; MEC - moluscos eliminando cercárias; MNE - moluscos não expostos; (-) = Não há moluscos vivos.**

Espécie	Número de miracídeos		Semanas após a exposição								
			1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Biomphalaria tenagophila</i>	10	MNEC	0	7,8±3,6	7,7±3,4	12,9±7,1	10,1±5,3	13,8±6,9	21,1±7,9	11,3±3,7	15±6,3
		MEC	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	25	MNEC	0	6,8±3,6	11,6±5,6	15,1±6,9	13,8±5,1	15,4±8,7	17,9±10,5	13,8±7,2	14,7±5,7
		MEC	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	50	MNEC	0	5,4±3,2	7±4	6,6±5	8,4±4,2	-	-	-	-
		MEC	0	4,2±1,2	1,8±0,7	1,3±0,5	-	-	-	-	-
	100	MNEC	0	7,8±3,3	10,8±6,2	18,7±12,1	11,3±6,6	11,5±7,2	24,7±13,6	17,3±11,6	15,5±7,3
		MEC	0	8±2,2	15±9,5	-	-	-	-	-	-
	Controle	MNE	0	0	0	7,6±6,1	8,6±3,7	11,5±5,1	12,2±3,2	11±6,6	9,9±6,9

**Tabela 4.15 - Média semanal de ovos férteis por desova de *Biomphalaria tenagophila* isolado do município de São José dos Campos, SP após a exposição a 10, 25, 50 ou 100 miracídeos de *Echinostoma paraensei*; MNEC - moluscos não eliminando cercárias; MEC - moluscos eliminando cercárias; MNE - moluscos não expostos; (-) = Não há moluscos vivos.**

Espécie	Número de miracídeos		Semanas após a exposição								
			1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Biomphalaria tenagophila</i>	10	MNEC	0	6,9±3,5	6,9±3,3	11,4±6,9	10±5,3	13,5±7,4	18,9±6,9	10,9±3,9	13,3±5,8
		MEC	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	25	MNEC	0	6,5±3,6	10,3±5,8	13,4±5,8	12,9±5	13,5±8,2	16,8±10,1	11,7±5,5	13±5,9
		ME	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	50	MNEC	0	4,8±2,8	6,6±3,7	6,2±5,2	6,2±3,2	-	-	-	-
		ME	0	2,5±0,6	1,8±0,8	1,3±0,5	-	-	-	-	-
	100	MNEC	0	6,9±3,2	8,7±5,4	18±12,1	11,3±6,6	10,8±7,3	22,5±14,2	17,1±11,6	13±6,6
		ME	0	8±2,2	12,3±10,6	-	-	-	-	-	-
	Controle	MNE	0	0	0	7,5±6,1	8,6±3,7	11,5±5,1	12,2±3,2	10,7±6,7	8,8±7,1

**Tabela 4.16 – Análise de variância de medidas repetidas das desovas, ovos e ovos férteis postos entre os moluscos eliminadores de cercárias (E), não eliminadores de cercárias (NE) e pertencentes ao grupo controle não exposto a miracídios (C) e os períodos (P) pré-patente e patente. Valores de significância:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) e  $p < 0,001$  (\*\*\*); NS (Não significativa).**

	<b>Espécies</b>								
	<i>Biomphalaria.tenagophila</i> isolado do Taim			<i>Biomphalaria tenagophila</i> isolado de São José dos Campos			<i>Biomphalaria glabrata</i> isolado de Sumidouro		
	<b>P</b>	<b>NI/I/C</b>	<b>Interação</b>	<b>P</b>	<b>NI/I/C</b>	<b>Interação</b>	<b>P</b>	<b>NI/I/C</b>	<b>Interação</b>
Desovas	104,9***	4,4*	8,4***	6,6*	27,6***	3,97057*	87,6***	17,8***	30,8***
Ovos	50,7***	20,6***	15,4***	NS	15,7***	NS	93,8***	27,6***	48,1***
Ovos férteis	46,6***	17,7***	14,5***	NS	15,1***	NS	88***	28,9***	47,5***

**Tabela 4.17 – Análise de variância de medidas repetidas entre as desovas, ovos e ovos férteis postos por moluscos eliminadores de cercárias, não eliminadores de cercárias e pertencentes ao grupo controle não exposto a miracídios, as doses de miracídios (DM) a que os moluscos foram expostos e os períodos (P) pré-patente e patente. Valores de significância:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) e  $p < 0,001$  (\*\*\*); NS (Não significativa).**

	Espécies								
	<i>Biomphalaria tenagophila</i> isolado do Taim			<i>Biomphalaria tenagophila</i> isolado de São José dos Campos			<i>Biomphalaria glabrata</i> isolado de Sumidouro		
	DM	Período	Interação	DM	Período	Interação	DM	Período	Interação
Desovas	2,9*	103,8***	NS	17,4***	NS	3,4*	8,4***	38,9***	8,7***
Ovos	3,8**	46***	NS	19,3***	21,5***	3,4*	10,5***	24,3***	11,2***
Ovos férteis	3,4*	43,8***	NS	21,1***	23,4***	2,8*	11,1***	23,8***	11,8***

**Tabela 4.18 – Análise de variância de medidas repetidas entre as desovas, ovos, ovos férteis postos por moluscos eliminadores de cercárias, e número de cercárias eliminadas e as doses de miracídios (DM) utilizadas na exposição e os períodos (P) pré-patente e patente. Valores de significância:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) e  $p < 0,001$  (\*\*\*); NS (Não significativa).**

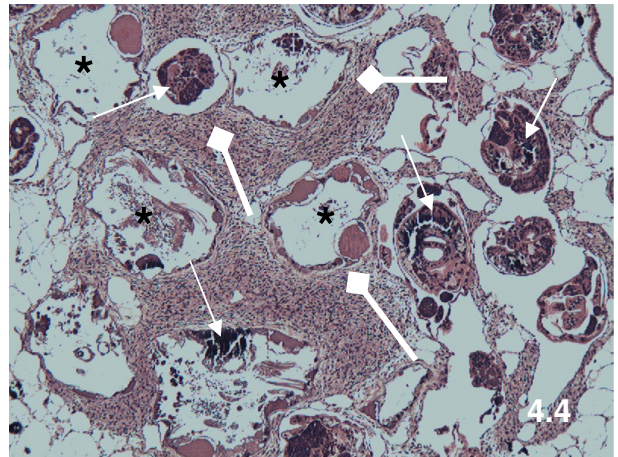
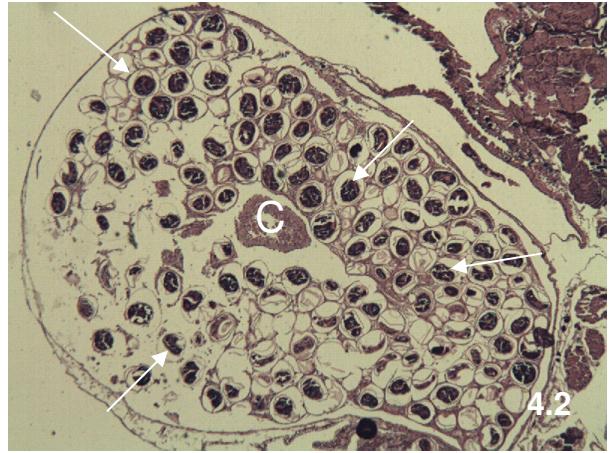
Infectados	Espécies					
	<i>Biomphalaria.tenagophila</i> isolado do Taim			<i>Biomphalaria glabrata</i> isolado de Sumidouro		
	DM	Período	Interação	DM	Período	Interação
Desovas	NS	NS	NS	NS	6,72470*	NS
Ovos	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Ovos Férteis	4,66177*	NS	NS	NS	NS	NS
Número de cercárias	5,4357*	-	-	NS	-	-

**Figura 4.1:** Saco pericárdico de *Biomphalaria tenagophila* isolado do Taim, RS, apresentando acúmulo de formas parasitárias de *Echinostoma paraensei* (→) e ausência de hemócitos na região. Ao centro encontra-se o coração (C). Microscopia óptica. Hematoxilina & Eosina, X 100.

**Figura 4.2:** Saco pericárdico de *Biomphalaria tenagophila* isolado do Taim, RS, apresentando tamanho aumentado devido ao elevado número de formas parasitárias de *Echinostoma paraensei* acumuladas (→). Microscopia óptica. Hematoxilina & Eosina, X 100.

**Figura 4.3:** Glândula digestiva de *Biomphalaria tenagophila* isolado do Taim, RS, apresentando algumas formas parasitárias de *Echinostoma paraensei* (→) e ausência de hemócitos na região. Microscopia óptica. Hematoxilina & Eosina, X 40.

**Figura 4.4:** Ovoteste de *Biomphalaria tenagophila* isolado do Taim, RS, apresentando formas parasitárias de *Echinostoma paraensei* (→) e remanescentes destruídos de células da própria região (\*). Presença de proliferação focal de hemócitos (◆) encapsulando tanto alguns remanescentes de células da região quanto as formas parasitárias. Microscopia óptica. Hematoxilina & Eosina, X 200.

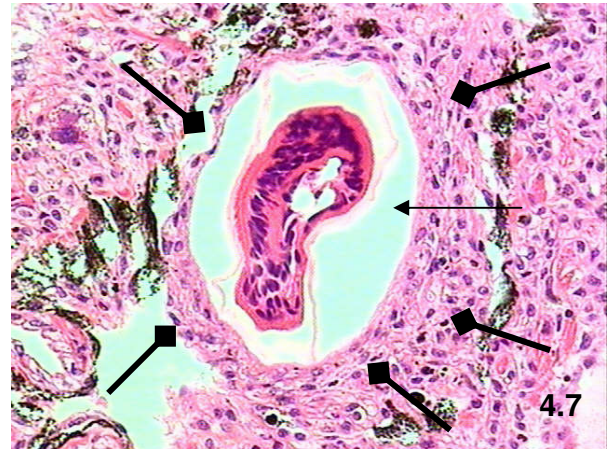
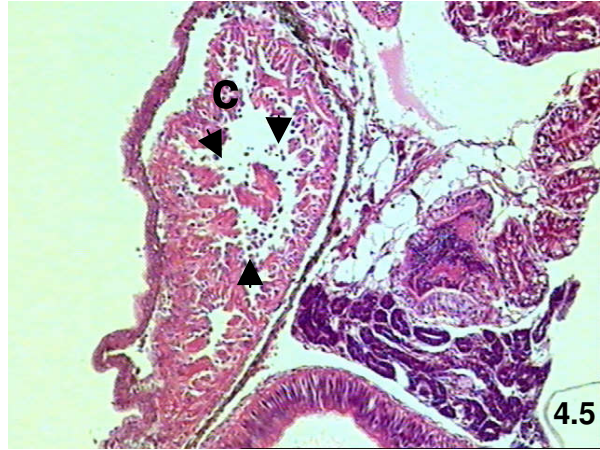




**Figura 4.5:** Coração (C) de *Biomphalaria tenagophila* isolado de São José dos Campos, SP, apresentando infiltrados de hemócitos (▶) na cavidade e ausência de formas parasitárias de *Echinostoma paraensei*. Microscopia óptica. Hematoxilina & Eosina, X 200.

**Figura 4.6:** Região próxima aos túbulos renais de *Biomphalaria tenagophila* isolado de São José dos Campos, SP, apresentando proliferação focal de hemócitos (◆) encapsulando forma parasitária de *Echinostoma paraensei* (→). Microscopia óptica. Hematoxilina & Eosina, X 100.

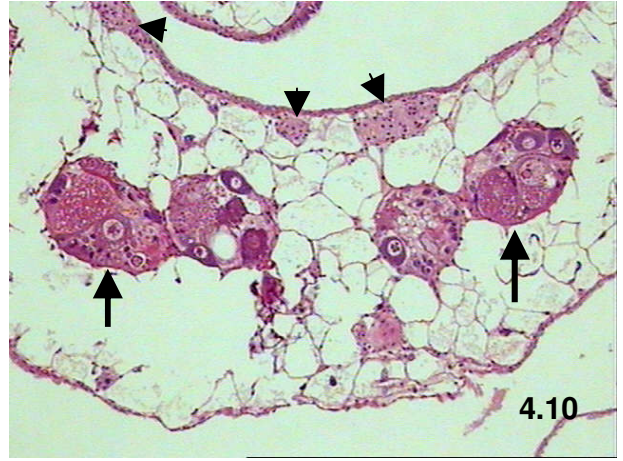
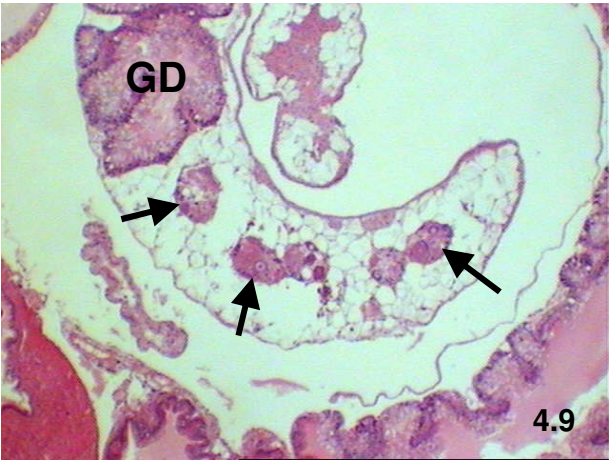
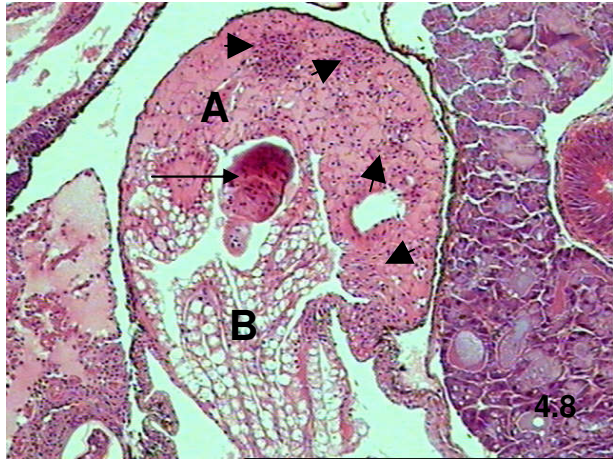
**Figura 4.7:** Detalhe da figura anterior, apresentando proliferação focal de hemócitos (◆) encapsulando a forma parasitária de *Echinostoma paraensei* (→). Microscopia óptica. Hematoxilina & Eosina, X 400.



**Figura 4.8:** Região dos túbulos renais de *Biomphalaria tenagophila* isolado de São José dos Campos, SP, apresentando reação inflamatória contra a forma parasitária de *Echinostoma paraensei* (→) com alteração do tecido local (A). Presença de infiltrados inflamatórios em determinados locais (▶). B= Tecido original. Microscopia óptica. Hematoxilina & Eosina, X 100.

**Figura 4.9:** Região do ovoteste de *Biomphalaria tenagophila* isolado de São José dos Campos, SP, apresentando poucos remanescentes de células que compõem o ovoteste (→). GD= Glândula digestiva. Microscopia óptica. Hematoxilina & Eosina, X 40.

**Figura 4.10:** Detalhe da figura anterior, apresentando remanescentes de células que compõem o ovoteste (→) e infiltrados inflamatórios (▶) aparentes. Microscopia óptica. Hematoxilina & Eosina, X 100.

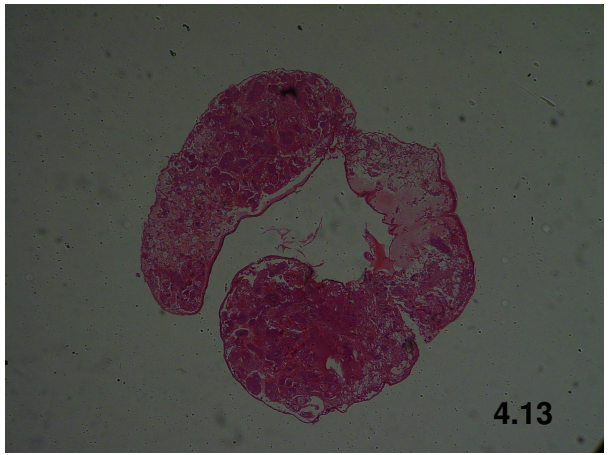
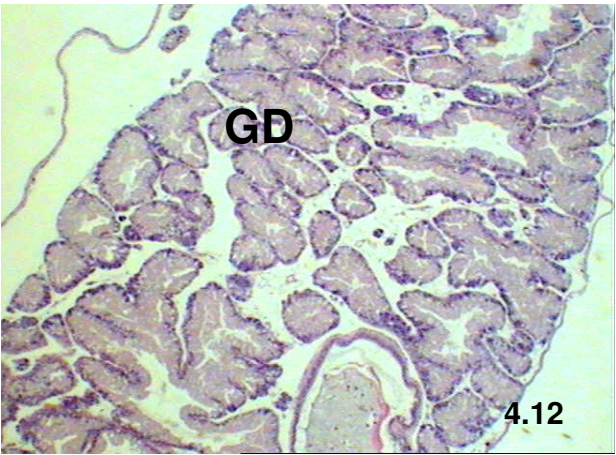


**Figura 4.11:** Coração (C) e Região dos túbulos renais (TR) de *Biomphalaria tenagophila* pertencente ao grupo controle não exposto a miracídios de *Echinostoma paraensei*. Microscopia óptica. Hematoxilina & Eosina, X100.

**Figura 4.12:** Glândula digestiva (GD) de *Biomphalaria tenagophila* pertencente ao grupo controle não exposto a miracídios de *Echinostoma paraensei*. Microscopia óptica. Hematoxilina & Eosina, X100.

**Figura 4.13:** Ovoteste de *Biomphalaria tenagophila* pertencente ao grupo controle não exposto a miracídios de *Echinostoma paraensei*. Microscopia óptica. Hematoxilina & Eosina, X 40.





## 5. DISCUSSÃO

### 5.1- Mortalidade

Parasitos podem determinar a sobrevivência do hospedeiro de diferentes formas, ou seja, quando a mortalidade ocorre logo após a exposição, provavelmente decorrem dos efeitos da compatibilidade. Enquanto a mortalidade é observada posteriormente, presumivelmente indica excessiva demanda de energia ou danos nos tecidos provocados pelo parasito (Bayne & Loker, 1987). Estudos baseados na mortalidade dos moluscos sugerem que as rédias impõem forte efeito negativo sobre a sobrevivência do hospedeiro durante o período pré-patente, enquanto as infecções por esporocistos diminuem a sobrevivência do hospedeiro em períodos mais tardios. Considerando diferentes hospedeiros, observa-se que limneídeos e planorbídeos apresentam padrões similares de reduzida sobrevivência do hospedeiro durante o período pré-patente. Entretanto, os moluscos pertencentes ao gênero *Lymnaea* pareceram sofrer maior mortalidade com a maturação da infecção (62% no período pré-patente e 60% no período patente) (Sorensen & Minchella, 2001).

Rosa et al. (2006), observaram que diferentes linhagens de *B. tenagophila* apresentaram diferentes níveis de suscetibilidade à infecção por *S. mansoni* exibindo também diferentes níveis de sobrevivência. Em *B. tenagophila* (isolado de Joinville, SC) suscetível à infecção por *S. mansoni* a taxa de sobrevivência foi reduzida a 60% após a exposição ao parasito. Por outro lado, em *B. tenagophila* (Taim), resistente à infecção por *S. mansoni*, nenhuma diferença na taxa de sobrevivência após a exposição por *Echinostoma paraensei* foi observada. Desta forma, a presença de *S. mansoni* em moluscos suscetíveis, é fator determinante da mortalidade podendo ser elemento de seleção natural, o qual é altamente negativo para os moluscos potencialmente transmissores da esquistossomose (Coelho, 1995).

Muñoz-Antoli et al. (2007) observaram diferentes efeitos na sobrevivência entre o limneídeo *Radix peregra* e o planorbídeo *Biomphalaria glabrata* infectados por *Echinostoma friedi*. Em *R. peregra*, a mortalidade tem início ainda no período pré-patente, porém ocorre de forma prolongada, enquanto nos moluscos *B. glabrata* infectados a mortalidade tem início em um período mais tardio, porém de forma explosiva. Schmidt et al. (1998), também observaram a influência da infecção sobre a sobrevivência de moluscos *B. glabrata* expostos a *E. caproni*. Os moluscos sofreram

um aumento significativo na mortalidade, o que segundo o autor, se deve à extensa destruição da glândula digestiva pelas rédias. Por outro lado, Kuris (1980) não observou nenhum efeito da exposição de uma linhagem de *E. caproni* proveniente da Etiópia sobre a sobrevivência de *B. glabrata*.

A mortalidade também está relacionada à penetração dos miracídios, ao aumento da demanda de energia devido ao desenvolvimento do sistema de defesa interno do molusco e ao desenvolvimento dos estágios intramolusco do parasito envolvendo a destruição dos tecidos. Desta forma, existe uma relação positiva entre a dose de miracídios utilizada na exposição e a mortalidade do molusco (Zakikhani & Rau, 1999; Tchuem Tchuente et al., 1999; Southgate et al., 2000; Moukrim et al., 1996). Por outro lado, nas infecções causadas por equinostomos, a sobrevivência dos moluscos parece ser mais afetada pela destruição causada pelos estágios de desenvolvimento intramolusco do trematódeo (Fried & Huffman, 1996).

Maldonado Jr. et al. (2001b) observaram que em *B. glabrata*, *Physa marmorata* e *Lymnaea columella* infectados por *E. paraensei* a mortalidade ocorre ao longo do tempo de infecção. Entretanto, em *L. columella* a mortalidade ocorreu predominantemente no período pré-patente. O mesmo padrão foi observado por Muñoz-Antoli et al. (2007) na infecção de *B. glabrata* por *E. friedi*.

Neste trabalho, não foi observada influência na sobrevivência de *B. tenagophila* (Taim) expostos a *E. paraensei*. Esse resultado concorda com o obtido por Rosa et al. (2006), no qual também não houve relação da mortalidade com o número de miracídios a que foram expostos os moluscos. Por outro lado, *B. glabrata* (SU) e *B. tenagophila* (SJC) infectadas por *E. paraensei* apresentaram taxas de mortalidade que chegaram a 60% e a 100%, respectivamente. Tal mortalidade se deu de forma prolongada, aumentando no decorrer do período de infecção para *B. glabrata* (SU) e de forma repentina para *B. tenagophila* (SJC). A mortalidade observada no período pré-patente provavelmente se explica pelo aumento da demanda de energia devido à proliferação de células do sistema de defesa interno do molusco em resposta à penetração dos miracídios e ao desenvolvimento dos estágios intramolusco do parasito envolvendo a destruição dos tecidos como proposto por Zakikhani & Rau (1999), Tchuem Tchuente et al. (1999), Southgate et al. (2000), Moukrim et al. (1996). De acordo com Maldonado Jr. et al. (2001b), tanto em *B. tenagophila* (Taim) quanto em *B. glabrata* (SU), o número de miracídios a que foram expostos não exerceu nenhuma influência sobre a



sobrevivência destes moluscos. A mortalidade observada em períodos mais tardios da infecção em *B. glabrata* (SU) se deu provavelmente à destruição dos tecidos pelos estágios intramolusco do parasito como proposto pelos autores acima citados.

## 5.2- Infectividade

Tem sido relatada a influência do número de miracídios utilizados na infecção dos moluscos no número de moluscos infectados e no número de cercárias eliminadas (Dreyfuss et al., 1999; Maldonado Jr. et al., 2001b). Dreyfuss et al. (1999) observaram correlação positiva entre o número de miracídios de *Fasciola hepatica* utilizados na exposição e a taxa de infectividade de *Lymnaea trunculata* (55% para moluscos expostos a 1 miracídio e 96,8% para moluscos expostos a 20 miracídios). Por outro lado, Maldonado Jr. et al. (2001b) não observaram relação da taxa de infecção por *E. paraensei* com o número de miracídios utilizados para a infecção em *Physa marmorata* e *Lymnaea columella*, enquanto em *B. glabrata* observaram correlação positiva entre o número de miracídios e a taxa de infecção.

Maldonado Jr. et al. (2001b) observou uma correlação positiva entre o número de miracídios de *Echinostoma paraensei* a que *B. glabrata*, *Physa marmorata* e *Lymnaea columella* foram expostos e o número de cercárias eliminadas. Por outro lado, Dreyfuss et al. (1999) não observaram nenhuma correlação entre o número de miracídios e o número de cercárias eliminadas.

Em nossos estudos, foi observada correlação positiva entre o número de miracídios e a taxa de infectividade a que *B. tenagophila* (Taim) foi exposto como observado por Dreyfuss et al. (1999). Correlação positiva também foi observada entre o número de miracídios e o número de cercárias eliminadas entre as doses de 25 e 50 miracídios, em acordo com as observações feitas por Maldonado Jr. et al. (2001b).

Em *B. glabrata* (SU) observou-se uma correlação positiva entre o número de miracídios e a infectividade nas doses de 10, 25 e 50 miracídios. Entretanto, não houve correlação entre o número de miracídios e o número de cercárias eliminadas como observado por Dreyfuss et al. (1999).

Em *B. tenagophila* (SJC), a taxa de infectividade foi dependente do número de miracídios, porém, a infecção só ocorreu nas doses mais elevadas, mostrando ser esse isolado o menos suscetível à infecção entre os moluscos testados. A alta taxa de

mortalidade sugere alto custo da resistência à infecção, como observado por Maldonado Jr. et al. (2001b) em seus estudos. Não houve correlação positiva entre o número de miracídios e o número de cercárias eliminadas, como observado por Dreyfuss et al. (1999).

### 5.3 Fecundidade e Fertilidade

Muitas infecções por trematódeos exercem efeitos marcantes em seus hospedeiros intermediários (Wright, 1966), podendo determinar, dentre outros aspectos biológicos do hospedeiro, a atividade reprodutiva (De Jong-Brink 1995; Dreyfuss et al., 1999; Zakikhani & Rau, 1999; Sorensen & Minchella, 2001).

Os tecidos reprodutores não são essenciais para a perpetuação dos moluscos. Os parasitos se adaptaram a utilizar estes tecidos ricos em recursos para assegurar seu crescimento e desenvolvimento nos hospedeiros. Infecções por trematódeos geralmente levam à redução ou completa inibição da atividade reprodutiva. Além disso, na maioria dos casos a inibição da atividade reprodutiva quase se completa quando as cercárias são eliminadas (Sorensen & Minchella, 2001). As rédias de *E. paraensei* se desenvolvem e se alimentam do tecido do ovoteste, sugerindo que a redução da fecundidade e da fertilidade decorre da ação do parasito (Langand et al., 1998; Haas, 2000).

Os moluscos *B. tenagophila* (Taim) e *B. glabrata* (SU) expostos que eliminaram cercárias apresentaram diminuição na fecundidade e na fertilidade, enquanto os moluscos que não eliminaram cercárias, a fecundidade e a fertilidade foram bastante similares às dos moluscos pertencentes ao grupo controle não exposto. Não houve correlação entre o número de miracídios e a fecundidade e fertilidade. A diferença da fecundidade e fertilidade entre os períodos encontrados nas duas espécies se explica pela imaturidade sexual dos moluscos no período pré-patente, a qual é alcançada no período patente. Neste sentido, a diminuição da fecundidade e fertilidade dos moluscos expostos que eliminaram cercárias se deve ao processo de inibição da atividade reprodutiva promovido pelos estágios de desenvolvimento intramolusco do parasito (Sorensen & Minchella, 2001).

*B. tenagophila* (SJC) apresentou um perfil um pouco diferente das espécies anteriores, onde os moluscos expostos que não eliminaram cercárias apresentaram

maior fecundidade e fertilidade que os moluscos pertencentes ao grupo controle. Tal fato foi também observado em infecções por esporocistos de esquistossomos os quais induziram um aumento da fecundidade de seus hospedeiros em relação aos controles não expostos a miracídios (Sorensen & Minchella, 2001)

#### 5.4 -Histopatologia

As populações de *B. tenagophila*, assim como *B. glabrata* possuem diferentes níveis de suscetibilidade à infecção por *Schistosoma mansoni* (Corrêa et al., 1979; Silva et al., 1994; Borda & Rea, 2007). Ambas as espécies têm sido freqüentemente estudadas no intuito de compreender melhor a interação parasito-hospedeiro (Paraense & Correa, 1963; Corrêa et al., 1979; Santos et al., 1979; Souza et al., 1995a, 1995b; Godoy et al., 1997; Guimarães et al., 1997; Souza et al., 1997; Borges et al., 1998; Martins-Souza et al., 2003; Coelho et al., 2004; Théron & Coustau, 2005; Coelho & Bezerra, 2006; Borda & Rea, 2007).

Estudos acerca das reações histopatológicas revelaram que na maioria dos moluscos tolerantes (suscetíveis) à infecção por *S. mansoni*, os esporocistos eram encontrados em diferentes estágios de diferenciação nos tecidos, porém com ausência de reação. As reações, quando ocorriam, consistiam tanto de proliferação difusa quanto focal. Por outro lado, nos moluscos que não eliminaram cercárias, foram observadas reações inflamatórias, entretanto, nenhum esporocisto viável foi encontrado (Guimarães et al., 1997; Souza et al., 1997; Borges et al., 1998; Borges & Andrade, 2003).

Em *B. tenagophila* onde não houve sucesso na infecção por *S. mansoni*, poucas e ocasionais reações inflamatórias do tipo focal foram observadas no ovoteste e na região dos túbulos renais (Souza et al., 1997; Borges et al., 1998).

Diferentemente, em *B. glabrata* onde também não houve sucesso na infecção por *S. mansoni*, as reações por hemócitos observadas consistiam tanto de proliferação focal quanto de proliferação difusa, acompanhada pela expansão da matriz extracelular lembrando o processo de fibrose observado nos vertebrados. As proliferações difusas, acompanhadas por expansão da matriz extracelular, ocorreram freqüentemente ao redor de ductos e tubos, especialmente na membrana externa do tubo digestivo e ao redor dos ácinos da glândula nidamental. A proliferação focal com expansão do estroma foi observada entre as glândulas digestivas e no ovoteste. A reação focal

freqüentemente assumia uma aparência de granuloma, com lesões encapsulantes observadas especialmente nas regiões tubular e sacular dos rins. Também foi observada nos tecidos conectivos margeando a cavidade do manto, mas foi rara na região podal e em outras áreas da porção anterior dos moluscos (Godoy et al; 1997; Souza et al., 1997; Borges et al., 1998; Borges & Andrade, 2003).

Para *B. glabrata* suscetíveis à infecção por *S. mansoni*, os esporocistos secundários foram observados com maior freqüência nos túbulos renais e ovoteste, seguido pela glândula de albúmen, glândula digestiva e outros tecidos. Quando as reações inflamatórias ocorriam, apresentavam intensidade moderada na região dos túbulos renais, glândula digestiva e outros tecidos, já no ovoteste pouca reação foi observada (Souza et al., 1997; Godoy et al., 1997).

Para *B. tenagophila* suscetíveis à infecção por *S. mansoni*, os esporocistos foram observados com certa freqüência na glândula digestiva, ovoteste e glândula de albúmen, e com menor freqüência na região dos túbulos renais. As reações inflamatórias, quando presentes, apresentavam maior intensidade no ovoteste, sendo moderadas na região dos túbulos renais e nas glândulas digestivas, e apresentando pouca reação na glândula de albúmen (Souza et al., 1997). O mesmo padrão foi observado para *B. tenagophila* (Taim) infectado por *E. paraensei*.

Dois tipos de mecanismos são propostos para a proteção contra a invasão por miracídios nos tecidos dos moluscos hospedeiros intermediários. Um deles, propõe a destruição direta dos miracídios logo após penetrarem nos tecidos dos moluscos. (Loker et al., 1986). O outro mecanismo propõe uma montagem bem sucedida de reações destrutivas após os esporocistos terem se disseminado pelos tecidos dos moluscos (Souza et al., 1997; Borges et al., 1998).

De acordo com Souza et al. 1997 e Borges et al. 1998, os moluscos *B. glabrata* seguem o padrão de resposta proposto pelo segundo mecanismo, enquanto *B. tenagophila* segue o padrão de resposta proposto por Loker et al. (1986).

De outra forma, estudos utilizando as populações *B. tenagophila* proveniente da Reserva do Taim, RS (resistente à infecção por *S. mansoni*), e *B. tenagophila* proveniente do município de Cabo Frio, RJ (moderadamente suscetível à infecção por *S. mansoni*) mostram que a resistência observada na linhagem proveniente do Taim está associada com uma intensa ativação e migração dos hemócitos para o sítio de infecção. Já no isolado de Cabo Frio, não houve intensa ativação e migração dos hemócitos para

o sítio de infecção. O mesmo foi observado em *B. glabrata* proveniente da cidade de Belo Horizonte, MG (altamente suscetível à infecção por *S. mansoni*) (Martins-Souza et al., 2009).

Estudos iniciais sobre investigações acerca da resistência e suscetibilidade nos moluscos *B. glabrata* utilizaram além do modelo convencional (*B. glabrata* - *S. mansoni*), o modelo *B. glabrata* - *Echinostoma spp* (Lie & Heyneman, 1975; Lie et al., 1975; Lie & Heyneman, 1976a, 1976b, 1976c; Lie et al., 1977a, 1977b; Lie et al., 1980a, 1980b; Lie, 1982; Noda & Loker, 1989; Adema et al. 1999; Ataev & Coustau, 1999; Humbert & Coustau, 2001).

*B. glabrata* apresenta um amplo espectro de suscetibilidade à infecção por *E. lindoense*, evidenciada pela velocidade das reações nos tecidos por hemócitos e pela total, parcial ou nenhuma destruição das formas parasitárias. Nos moluscos menos suscetíveis, onde não houve sucesso da infecção, observou-se que todos os esporocistos foram destruídos nos tecidos logo após os miracídios terem atravessado os tecidos e logo após os esporocistos alcançarem o coração. Em moluscos altamente suscetíveis, todos os esporocistos migraram com sucesso e rapidamente ao coração onde completaram seu desenvolvimento sem induzir nenhuma reação tecidual. Outros moluscos considerados como parcialmente suscetíveis, destruíram vários esporocistos nos tecidos, e apenas os esporocistos que obtiveram sucesso em alcançar o ventrículo e a aorta sobreviveram, embora em alguns casos grandes agregados de hemócitos tenham se formado no ventrículo. Apesar disso, houve continuidade na infecção neste grupo intermediário, que representou a maioria dos moluscos *B. glabrata* testados. Os agregados de hemócitos podem preencher toda a cavidade ventricular, levando ao comprometimento da função cardíaca e ocasionando a morte do molusco (Lie & Heyneman, 1975, 1976a, 1976b, 1976c; Lie et al., 1976a).

Provavelmente, tais reações também ocorram na infecção por *E. paraensei*, uma vez que os mesmos possuem biologia muito similar a *E. lindoense*, sendo distinguidos um do outro principalmente com base na morfologia da cercária (Lie & Heyneman, 1975).

Neste trabalho, ao contrário do que ocorre na infecção por *S. mansoni*, *B. tenagophila* (Taim), mostrou-se altamente suscetível à infecção por *E. paraensei*, onde os cortes histológicos revelaram várias formas parasitárias em diversos estágios de desenvolvimento sob reação inflamatória apenas no ovoteste, e tendo o saco

pericárdico, glândula digestiva e o ovoteste como os locais mais colonizados pelo parasito. Portanto, na infecção por *E. paraensei*, *B. tenagophila* (Taim) desenvolveu padrão reacional à infecção semelhante ao apresentado por *B. glabrata* altamente suscetível à infecção por *S. mansoni* (Lie & Heyneman, 1976b).

Por outro lado, *B. tenagophila* (SJC) mostrou-se pouco suscetível à infecção por *E. paraensei*, ao contrário do que ocorre durante a infecção por *S. mansoni*, para a qual esta linhagem se mostra moderadamente suscetível. Na infecção por *E. paraensei*, observou-se ausência de parasitos no coração. Adicionalmente, muitos hemócitos puderam ser observados indicando terem sido recrutados para o local, uma vez que não foi observada proliferação de parasitos nesse sítio. Por sua vez, intensa reação foi observada nos túbulos renais e em uma região próxima a estes, consistindo tanto de proliferação focal apresentando o parasito encapsulado quanto de proliferação difusa com alteração do tecido local lembrando o processo de fibrose que ocorre nos vertebrados e alguns infiltrados de hemócitos. Alguns focos proliferativos também puderam ser vistos na região do ovoteste, indicando que houve reação na região. Desta forma, neste isolado, a infecção por *E. paraensei* mostrou-se muito similar à *B. glabrata* pertencente ao grupo intermediário proposto por Lie & Heyneman (1976b) e a *B. tenagophila* (isolado de Belo Horizonte, MG) suscetível à infecção por *S. mansoni*, mas que apresentaram pouca suscetibilidade à infecção por este trematódeo (Souza et al., 1997; Borges et al., 1998).

Os diferentes resultados observados em *Biomphalaria* spp. infectados por *S. mansoni* ou *Echinostoma* spp. reforçam a hipótese de que ambos os trematódeos utilizam diferentes vias de evasão do sistema de defesa interno dos moluscos, indicando que não apenas o fator genético dos moluscos é responsável pela suscetibilidade, e que as características biológicas do trematódeo determinam o curso da infecção (Lie et al., 1975, 1976b; 1977a, 1977b; Lie & Heyneman, 1976a, 1976c; Lie, 1982; Noda & Loker, 1989; Loker & Adema, 1995; DeGaffé & Loker, 1997). Tal fato pode ser percebido, principalmente ao se observar os padrões de infecção apresentados pelos moluscos *B. tenagophila* (Taim), que ao serem infectados por diferentes isolados (cepas) de *S. mansoni*, não há continuidade no desenvolvimento parasitário intramolusco (Coelho et al., 2004). Por outro lado, quando infectados por *E. paraensei*, o desenvolvimento parasitário intramolusco ocorre normalmente, havendo pouca ou nenhuma proliferação hemocitária nos tecidos.

## 6. CONCLUSÕES

1- Na infecção por *E. paraensei*, *B. tenagophila* (isolado do Taim) e *B. glabrata* (isolado de Sumidouro) mostraram-se suscetíveis, enquanto *B. tenagophila* (isolado de São José dos Campos), mostrou-se pouco suscetível.

2- A infecção influenciou a fecundidade e a fertilidade nos moluscos expostos que eliminaram cercárias.

3- O número de miracídios na infecção foi, em geral, determinante para a infectividade dos moluscos, entretanto, não influenciou no número de cercárias eliminadas pelos mesmos.

4- A mortalidade foi determinada pela infecção para as espécies estudadas sendo maior em *B. tenagophila* (isolado de São José dos Campos).

5- *B. tenagophila* (isolado do Taim) não mostrou reações teciduais frente à intensa proliferação de parasitos na maioria dos tecidos, com exceção do ovoteste. Por outro lado, *B. tenagophila* (isolado de São José dos Campos) apresentou intensa reação tecidual com proliferação de hemócitos difusa e focal.

6- A infecção pode causar inibição da atividade reprodutiva nos moluscos uma vez que as células do ovoteste são quase totalmente destruídas pelo parasito.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adema CM, Hertel LA, Loker ES. Evidence from two planorbid snails of a complex and dedicated response to digenean (echinostome) infection. *Parasitology* 1999 May 18, 119 (4): 395-404.

Ataev GL, Coustau C. Cellular response to *Echinostoma caproni* infection in *Biomphalaria glabrata* strains selected for susceptibility/ resistance. *Dev. Comp. Immunol.* 1999 February 23, 187-98.

Balan DSL, Magalhães LA, Piedrabuena AE. Aspectos imunológicos e parasitológicos em *Biomphalaria tenagophila* infectadas por *Schistosoma mansoni* e outros Digenea. *Rev. saúde pública* 1993, 27 (6): 421-9.

Barbosa L, Caldeira RL, Carvalho OS, Vidigal THDA, Jannotti-Passos LK, Coelho PMZ. Resistance to *Schistosoma mansoni* by transplantation of APO *Biomphalaria tenagophila*. *Parasite Immunol.* 2006 May, 28 (5): 209-12.

Bayne CJ, Loker Es. Survival within the snail host. In: Rollinson D, Simpson AJD, editores. *The Biology of Schistosomes: From Genes to Latrines*. San Diego: Academic Press Ltd.; 1987. p. 321-46.

Bezerra FSM, Machado JAN, Souza RLM, Chaves MM, Correa RF, Coelho PMZ. Effect of gamma radiation on the activity of hemocytes and on the course of *Schistosoma mansoni* infection in resistant *Biomphalaria tenagophila* snails. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2003 January, 98 (1): 73-5.

Boaventura MF, Fernandez MA, Thiengo SC, Silva RE, De Melo AL. Formas larvais de Trematoda provenientes de gastrópodes límnicos da microrregião Rio de Janeiro, sudeste do Brasil. *Lundiana* 2002, 3 (1): 45-9.



Borda CE, Rea MJF. *Biomphalaria tenagophila* potencial vector of *Schistosoma mansoni* in the Paraná River basin (Argentina and Paraguay). Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2007 March, 102 (2): 191-5.

Borges CM, Souza CP, Andrade ZA. Histopathologic features associated with susceptibility and resistance of *Biomphalaria* snails to infection with *Schistosoma mansoni*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1998 August, 93 (Suppl. 1): 117-21.

Borges CMC, Andrade ZA. Extra-cellular matrix changes in *Schistosoma mansoni* infected *Biomphalaria glabrata*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2003 January, 98 (1): 135-9.

Borges CMC. Hemócitos de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) na interação com *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907) [Tese]. Salvador: Universidade Federal da Bahia; 2005.

Borges CMC, Azevedo CM, Andrade ZA. A contribution to the pathobiology of *Biomphalaria glabrata* hemocytes. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2006 September, 101 (Suppl. 1): 193-8.

Carson FL, Martin JH, Lynn JÁ. Formalin fixation for electron microscopy: a re-evaluation. Am. J. Clin. Pathol. 1973, 59: 365-73.

Carvalho OS, Passos LKJ, Mendonça CLFG, Cardoso PCM, Caldeira RL. Introdução. In: Carvalho OS, Passos LKJ, Mendonça CLFG, Cardoso PCM, Caldeira RL. Moluscos de importância médica no Brasil. 7ª ed. Belo Horizonte: Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz; 2005a. p. 12-3.

Carvalho OS, Passos LKJ, Mendonça CLFG, Cardoso PCM, Caldeira RL. Moluscos de importância médica. In: Carvalho OS, Passos LKJ, Mendonça CLFG, Cardoso PCM, Caldeira RL. Moluscos de importância médica no Brasil. 7ª ed. Belo Horizonte: Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz; 2005b. p. 16-42.

Coelho JR, Bezerra FSM. Compatibility of *Biomphalaria tenagophila* with *Schistosoma mansoni*: a study of homologous plasma transference. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2006 February, 101 (1): 111-2.

Coelho PMZ. Relação molusco / parasita: resistência e susceptibilidade à infecção por *Schistosoma mansoni* em caramujos do gênero *Biomphalaria*. In: Barbosa FS editor. Tópicos em Malacologia Médica. Rio de Janeiro: Fiocruz; 1995. p. 208-18.

Coelho PMZ, Carvalho OS, Andrade ZA, Martins-Souza RL, Rosa FM, Barbosa M, et al. *Biomphalaria tenagophila*/*Schistosoma mansoni* interaction: premises for a new approach to biological control of schistosomiasis. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2004, 99 (Suppl. I): 109-11.

Cooper LA, Richards CS, Lewis FA, Minchella DJ. *Schistosoma mansoni*: relationship between low fecundity and reduced susceptibility to Parasite infection in the snail *Biomphalaria glabrata*. Exp. Parasitol. 1994, 79: 21-28.

Corrêa MCR, Coelho PMZ, Freitas JR. Susceptibilidade de linhagens de *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria glabrata* a duas cepas de *Schistosoma mansoni* (LE Belo Horizonte MG e SJ São José dos Campos SP). Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 1979 Março-Abril, 21 (2): 72-6.

Costa, MJFS, Gault CE, Confalonieri UEC. Comparative study 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 June, 46 (3): 157-63.

Coustau C, Théron A. Resistant or resisting: seeking consensus terminology. Trends Parasitol. 2004 May, 20 (5): 209-10.

Davis NE. Endemic echinostome infections of candidate hosts. J. Helminthol. 2005 June, 79 (2): 127-32.

De Gaffé G, Loker ES. Susceptibility of *Biomphalaria glabrata* to infection with *Echinostoma paraensei*: correlation with the effect of Parasite secretory-excretory products on host hemocyte spreading. J. Invertebr. Pathol. 1998 August 27, 71: 64-72.

De Jong-Brink M. How schistosomes profit from the stress responses they elicit in their hosts. Adv. Parasitol. 1995, 35: 177-256.

Detwiler JT, Minchella DJ. Intermediate host availability masks the strength of experimentally-derived colonisation patterns in echinostome trematodes. Int. J. Parasitol. 2009 April, 39 (5): 585-90.

Dreyfuss G, Vignoles P, Rondelaud D, Vareille-Morel C. Fasciola hepatica: characteristics of infection in Lymnaea trunculata in relation to the number of miracidia at exposure. Exp. Parasitol. 1999, 92: 19-23.

El-Ansary A, Al-Daihan S. Important aspects of Biomphalaria snail-schistosome interactions as targets for antischistosome drug. Med. Sci. Monit. 2006 December, 12 (12): RA282-92.

Freire N, Rodrigues-Silva R, Machado-Silva JR, Rey L. A comparative parasitologic study on *Biomphalaria glabrata* snail and C3H/He mice infected with human and murine isolates of *Schistosoma mansoni* derived from Sumidouro, Rio de Janeiro, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2003 September, 98 (6): 783-7.

Fried B, Huffman JE. The biology of the intestinal trematode *Echinostoma caproni*. Adv. Parasitol. 1996, 38: 311-68.

Fried B. Maintenance, cultivation, and excystation of echinostomes. In: Fried B, Graczyk TK. Echinostomes as Experimental Models for Biological Research. Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 2000. p. 99-118.

Godoy A, Souza CPS, Guimarães CT, Andrade ZA. Unusual histological findings in *Biomphalaria glabrata* with high degree of resistance to *Schistosoma mansoni* miracidia. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1997 February, 92 (1): 121-2.

Guimarães CT, Soares DM, Andrade ZA, Souza CP. Resistência de *Biomphalaria glabrata* à infecção pelo *Schistosoma mansoni*: variações no período pré-patente e na compatibilidade. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 1997 Agosto, 30 (4): 273-278.

Haas W. The behavioral biology of Echinostomes. In: Fried B, Graczyk TK. Echinostomes as Experimental Models for Biological Research. Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 2000. p. 175-195.

Horak P, van der Knaap WPW. Lectins in snail-trematode immune interactions: a review. Folia Parasitol. 1997, 44: 161-72.

Humbert E, Coustau C. Refractoriness of host haemocytes to parasite immunosuppressive factors as a putative resistance mechanism in the *Biomphalaria glabrata* – *Echinostoma caproni* system. Parasitology 2001, 122: 651-60.

Jourdane J, Cheng TC. The two-phase recognition process of allografts in a Brazilian strain of *Biomphalaria glabrata*. J. Invertebr. Pathol. 1987 March, 49 (2): 145-58.

Kanev I, Sterner M, Radev V, Fried B. An overview of the biology of Echinostomes. In: Fried B, Graczyk TK. Echinostomes as Experimental Models for Biological Research. Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 2000. p. 1-29.

Kawazoe U. Alguns aspectos da biologia de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) e *Biomphalaria tenagophila* (D'Orbigny, 1835) (Pulmonata, Planorbidae). I – Duração do período embrionário. Rev. saúde pública 1976, 10: 57-64.

Kawazoe U. Alguns aspectos da biologia de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) e *Biomphalaria tenagophila* (D'Orbigny, 1835) (Pulmonata, Planorbidae). II- Fecundidade e fertilidade. Rev. saúde pública 1977, 11: 47-64.

Kostadinova A, Gibson DI. The systematics of the echinostomes. In: Fried B, Graczyk TK. Echinostomes as Experimental Models for Biological Research. Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 2000. p. 31-57.

Kuris AM. Effect of exposure to *Echinostoma liei* miracidia on growth and survival of young *Biomphalaria glabrata* snails. Int. J. Parasitol. 1980 August, 10 (4): 303-8.

Langand J, Jourdane J, Coustau C, Delay B, Morand S. Cost of resistance, expressed as a delayed maturity, detected in the host-parasite system *Biomphalaria glabrata*/*Echinostoma caproni*. Heredity 1998, 80: 320-325.

Lie KJ, Basch PF. The life history of *Echinostoma paraensei* sp. N. (Trematoda: Echinostomatidae). J. Parasitol. 1967 December, 53: 1192-99.

Lie KJ, Heyneman D. Studies on resistance in snails: a specific tissue reaction to *Echinostoma lindoense* in *Biomphalaria glabrata* snails. Int. J. Parasitol. 1975 January, 5: 621-5.

Lie KJ, Heyneman D, Lim K. Studies on resistance in snails: specific resistance induced by irradiated miracidia of *Echinostoma lindoense* in *Biomphalaria glabrata* snails. Int. J. Parasitol. 1975 January, 5: 627-31.

Lie KJ, Heyneman D. Studies on resistance in snails: tissue reactions to *Echinostoma lindoense* sporocysts in sensitized and resensitized *Biomphalaria glabrata*. J. Parasitol. 1976a February, 62 (1): 51-8.

Lie KJ, Heyneman D. Studies on resistance in snails: tissue reactions to *Echinostoma lindoense* in naturally resistant *Biomphalaria glabrata*. J. Parasitol. 1976b April, 62 (2): 292-7.

Lie KJ, Heyneman D. Studies on resistance in snails: escape of *Echinostoma lindoense* sporocysts from encapsulation in the snail heart and subsequent loss of the host's ability to resist infection by the same parasite. J. Parasitol. 1976c April, 62 (2): 298-302.

Lie KJ, Heyneman D., Jeong KH. Studies on resistance in snails: induction of ventricular capsules and changes in the amebocyte-producing organ during sensitization of *Biomphalaria glabrata* snails. J. Parasitol. 1976a April, 62 (2): 286-91.

Lie KJ, Heyneman D., Jeong KH. Studies on resistance in snails: evidence of interference with the defense reaction in *Biomphalaria glabrata* by trematode larvae. J. Parasitol. 1976b August, 62 (4): 608-15.

Lie KJ, Heyneman D, Richards CS. Studies on resistance in snails: interference by nonirradiated Echinostome larvae with natural resistance to *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*. J. Invertebr. Pathol. 1977a August 19, 29 (2): 118-25.

Lie KJ, Heyneman D, Richards CS. *Schistosoma mansoni*: Temporary Reduction of natural resistance in *Biomphalaria glabrata* induced by irradiated miracidia of *Echinostoma paraensei*. Exp. Parasitol. 1977b February 18, 43: 54-62.

Lie KJ, Jeong KH, Heyneman D. Tissue reactions induced by *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*. Ann. Trop. Med. Parasitol. 1980a January 23, 74 (2): 157-66.

Lie KJ, Jeong KH, Heyneman D. Inducement of miracidia-immobilizing substance in the hemolymph of *Biomphalaria glabrata*. Int. J. Parasitol. 1980b July 30, 10: 183-88.

Lie KJ. Survival of *Schistosoma mansoni* and other trematode larvae in the snail *Biomphalaria glabrata*. A discussion of the interference theory. Trop. Geogr Med. 1982 April 24, 34: 111-22.

Lima LC. Planorbídeos Neotropicais de Importância Médica. In: Coura JR. Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005 p. 99-111.

Loker ES, Bayne CJ, Yui MA. *Echinostoma paraensei*: hemocytes of *Biomphalaria glabrata* as targets of Echinostome mediated interference with host snail resistance to *Schistosoma mansoni*. Exp. Parasitol. 1986 January 2, 62: 149-54.

Loker ES, Cimino DF, Stryker GA, Hertel LA. The effect of size of M line *Biomphalaria glabrata* on the course of development of *Echinostoma paraensei*. J. Parasitol. 1987, 73: 1090-8.

Loker ES, Cimino DF, Hertel LA. Excretory-secretory products of *Echinostoma paraensei* sporocysts mediate interference with *Biomphalaria glabrata* hemocyte functions. J. Parasitol. 1992, 78: 104-115.

Loker ES, Adema CM. Schistosomes, Echinostomes and snails: comparative immunobiology. Parasitol. Today 1995, 11 (3): 120-4.

Loker ES, Adema CM, Zhang SM, Kepler TB. Invertebrate immune systems – not homogeneous, not simple, not well understood. Immunol. Rev. 2001, 198: 10-21.

Lutz A. Estudos sobre a evolução dos Endotrematodes brasileiros. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1924. 17: 55-73.

Maldonado Jr. A Jr, Loker ES, Morgan JAT, Rey L, Lanfredi RM. Description of the adult worms of a new brazilian isolate of *Echinostoma paraensei* (Platyhelminthes: Digenea) from its natural vertebrate host *Nectomys squamipes* by light and scanning electron microscopy and molecular analysis. Parasitol. Res. 2001a October, 87 (10): 840-8.

Maldonado Jr. A Jr, Vieira GO, Garcia JS, Rey L, Lanfredi RM. Biological aspects of a new isolate of *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae): susceptibility of sympatric snails and the natural vertebrate host. Parasitol. Res. 2001b October, 87 (10): 853-59.

Maldonado Jr. A Jr, Gentile R, Fernandes-Moraes CC, D'Andrea PS, Lanfredi RM, Rey L. Helminth communities of *Nectomys squamipes* naturally infected by the exotic trematode *Schistosoma mansoni* in southeastern Brazil. J. Helminthol. 2006 December, 80 (4): 369-75.

Maldonado Jr. A Jr, Lanfredi RM. Echinostomes in the wild. In: Fried B, Toledo R. The Biology of Echinostomes. From the Molecule to the Community. New York: Springer; 2009. p. 129-145.

Martins-Souza RL, Pereira CAJ, Coelho PMZ, Negrão-Corrêa D. Sílica treatment increases the susceptibility of the Cabo Frio strain of *Biomphalaria tenagophila* to *Schistosoma mansoni* infection but does not alter the natural resistance of the Taim strain. Parasitol. Res. 2003 December, 91 (6): 500-7.

Martins-Souza RL, Pereira CAJ, Coelho PMZ, Martins-Filho OA, Negrão-Corrêa D. Flow cytometry analysis of the circulating haemocytes from *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria tenagophila* following *Schistosoma mansoni* infection. Parasitology 2009 January, 136 (1): 67-76.

McCurdy DG, Forbes MR, Boates JS. Male amphipods increase their mating effort before behavioural manipulation by trematodes. Can. J. Zool. 2000, 78: 606-12.

Moukrim A, Zekhnini A, Rondelaud D. *Schistosoma haematobium*: influence of the number of miracidia on several characteristics of infection in newborn *Planorbarius metidjensis*. Parasitol. Res. 1996, 82 (3): 267-9.

Muñoz-Antoli C, Marín A, Toledo R, Esteban JG. Effect of *Echinostoma friedi* (Trematoda: Echinostomatidae) experimental infection on longevity, growth and fecundity of juvenile *Radix peregra* (Gastropoda: Lymnaeidae) and *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda: Planorbidae) snails. Parasitol. Res. 2007 September, 101: 1663-70.

Noda S, Loker ES. Effects of infection with *Echinostoma paraensei* on the circulating haemocyte population of the host snail *Biomphalaria glabrata*. Parasitology 1989 February, 98 (Pt 1): 35-41.

Paraense WL, Corrêa LR. Variation in susceptibility of populations of *Australorbis glabratus* to a strain of *Schistosoma mansoni*. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 1963 January-February, 5: 15-22.



Paraense WL, Corrêa LR. Observations on two biological races of *Schistosoma mansoni*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz Julho-Setembro 1981, 76 (3): 287-91.

Parker GA, Chubb JC, Roberts GN, Michaud M, Milinski M. Optimal growth strategies of larval helminths in their intermediate hosts. J. Evol. Biol. 2003 January, 16 (1): 47-54.

Pereira CAJ, Martins-Souza RL, Corrêa Jr A, Coelho PMZ, Negrão-Corrêa D. Participation of cell-free haemolymph of *Biomphalaria tenagophila* in the defence mechanism against *Schistosoma mansoni* sporocysts. Parasite Immunol. 2008 November-December, 30 (11-12): 610-9.

Ratcliffe NA. Invertebrate immunity – A primer for the now specialist (review). Immunol. Lett. 1985, 10 (5): 253-70.

Reis SMPM, Magalhães LA, Carvalho JF. Ação da inoculação de hemolinfa no mecanismo de defesa de *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835). Rev. saúde pública 1995, 29 (4): 259-64.

Rosa FM, Caldeira RL, Carvalho OS, Godard ALB, Coelho PMZ. Dominant character of the molecular marker of a *Biomphalaria tenagophila* strain (Mollusca: Plarnobidae) resistant to *Schistosoma mansoni*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2004 February, 99 (1): 85-7.

Rosa FM, Godard ALB, Azevedo V, Coelho PMZ. *Biomphalaria tenagophila*: dominant character of the resistance to *Schistosoma mansoni* in descendants of crossbreedings between resistant (Taim, RS) and susceptible (Joinville, SC) strains. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2005 February, 100 (1): 19-23.

Rosa FM, Godard ALB, Negrão-Correa D, Rodrigues HA, Carvalho OS, Caldeira RL, et al. *Biomphalaria tenagophila*: dynamics of populations of resistant and susceptible strains to *Schistosoma mansoni*, with or without pressure of the parasite. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2006, 101 (Suppl. 1): 247-51.

Saap KK, Loker ES. Mechanisms underlying digenean-snail specificity: role of miracidial attachment and host plasma factors. *J. Parasitol.* 2000 October, 86 (5): 1012-19.

Santos MBL, Freitas JR, Correia MCR, Coelho PMZ. Suscetibilidade ao *Schistosoma mansoni* de híbridos de *Biomphalaria tenagophila* do Taim, RS, Cabo Frio, RJ, e Belo Horizonte, MG. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 1979 Novembro-Dezembro, 21 (6): 281-6.

Sasaki Y, Furuta E, Kirinoki M, Seo N, Matsuda H. Comparative studies on the internal defense system of Schistosome-resistant and -susceptible amphibious snail *Oncomelania nosophora*. Comparative morphological and functional studies on hemocytes from both snails. *Zool. Sci.* 2003 October, 20 (10): 1215-22.

Schmidt KA, Fried B, Haseeb MA. Effect of *Echinostoma caproni* infection on survival, growth, and fecundity of juvenile *Biomphalaria glabrata*. *Journal of the Helminthological Society of Washington* 1998 January, 65 (1): 95-8.

Silva RE, Melo AL, Pereira LH. Suscetibilidade de *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria glabrata* de uma mesma região a duas cepas de *Schistosoma mansoni*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 1994 setembro-outubro, 36 (5): 409-15.

Silva RR, Silva JRM, Faerstein NF, Lenzi HL, Rey L. Natural infection of wild rodents by *Schistosoma mansoni* parasitological aspects. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1992, 87 (Suppl. I): 271-6.

Sminia T, Barendsen L. A comparative morphological and enzyme histochemical study on blood cells of the freshwater snails *Lymnaea stagnalis*, *Biomphalaria glabrata* and *Bulinus truncatus*. *J. Morphol.* 1980, 165: 31-9.

Sorensen RE, Minchella DJ. Snail-trematode life history interactions: past trends and future directions. *Parasitology* 2001, 123 (Suppl. S3-S18).

Southgate VR, Tchuem Tchuente LA, Theron A, Jourdane J, Ly A, Moncrieff CB, et al. Compatibility of *Schistosoma mansoni* Cameroon and *Biomphalaria pfeifferi* Senegal. *Parasitology* 2000 November, 121 (Pt 5): 501-5.

Souza CP, Passos LKJ, Freitas JR. Degree of host-parasite compatibility between *Schistosoma mansoni* and their intermediate molluscan hosts in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1995a February, 90 (1): 5-10.

Souza CP, Cunha RCP, Andrade ZA. Development of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria tenagophila*, *Biomphalaria straminea* and *Biomphalaria glabrata*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 1995b Junho, 37 (3): 201-6.

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 August, 92 (4): 517-22.

Souza SS, Andrade ZA. On the origin of the *Biomphalaria glabrata* hemocytes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2006 May 25, 101 (Suppl. I): 213-18.

Souza SS. A origem das células de defesa (hemócitos) em *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) [dissertação]. Salvador: Universidade Federal da Bahia; 2006.

Tchuem Tchuente LA, Southgate VR, Theron A, Jourdane J, Ly A, Gryseels B. Compatibility of *Schistosoma mansoni* and *Biomphalaria pfeifferi* in Northern Senegal. *Parasitology* 1999 June, 118 (6): 595-603.

Théron A, Coustau C. Are *Biomphalaria* snails resistant to *Schistosoma mansoni*? *J. Helminthol.* 2005 September, 79 (3):187-91.

Thiengo SC, Mattos AC, Santos SB, Fernandez MA. Freshwater snails and schistosomiasis mansoni in the state of Rio de Janeiro, Brazil: VI – Noroeste Fluminense Mesoregion.

Thomas F, Renaud F, Poulin R, Exploitation of manipulators: hitch-hiking as a parasite transmission strategy. *Anim. Behav.* 1998 July, 56 (1): 199-206.

Toledo R, Muñoz-Antoli C, Fried B. The use of Echinostomes to study host-parasite relationships between larval trematodes and invertebrates and cold-blooded vertebrate hosts. *Parasitol. Res.* 2007 May, 100 (6): 1177-85.

Trager W. Immunity in invertebrates. In: Trager W. *Living together. The biology of animal parasitism.* New York: Plenum Press; 1986. p. 247-252.

Wright CA. The pathogenesis of helminths in the mollusca. *Helmintol. Abstr.* 1966, 35: 207-24.

Yamaguchi K, Furuta E, Nakamura H. Chronic skin allograft rejection in terrestrial slugs. *Zool. Sci.* 1999, 16 (3): 485-95.

Zakikhani M, Rau ME. *Plagiorchis elegans* (Digenea: Plagiorchiidae) infections in *Stagnicola elodes* (Pulmonata: Lymnaeidae): Host susceptibility, growth, reproduction, mortality and cercarial production. *J. Parasitol.* 1999 June, 85 (3): 454-63.

Zanotti-Magalhães EM, Magalhães LA, Carvalho JF. Relação entre a patogenicidade de *Schistosoma mansoni* em camundongos e a susceptibilidade do molusco vetor. I. Infeciosidade das cercárias e carga de vermes. *Rev. saúde pública* 1991 Outubro, 25 (5): 359-66.

Zanotti-Magalhães EM, Magalhães LA, Carvalho JF. Relação entre a patogenicidade do *Schistosoma mansoni* em camundongos e susceptibilidade do molusco vetor. IV- Infeciosidade dos miracídeos. *Rev. saúde pública* 1997 Outubro, 31 (5): 488-94.

Zuim NRB, Zanotti-Magalhães EM, Magalhães LA, Linhares AX. Seleção genética de *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria tenagophila* visando a alteração da suscetibilidade e resistência ao *Schistosoma mansoni*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2005 Setembro-Outubro, 38 (5): 387-90.