

UFRRJ

**INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

DISSERTAÇÃO

**ANÁLISE FISIOLÓGICA DA AÇÃO DO LÁTEX DE
Euphorbia splendens var. *hislopii* N.E.B (EUPHORBIACEAE)
SOBRE *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (PULMONATA,
PLANORBIDAE) INFECTADA POR *Schistosoma mansoni*
Sambon, 1907 (TREMATODA, SCHISTOSOMATIDAE),
ASSOCIADA AO TEMPO DE DEGRADAÇÃO DO LÁTEX**

MARIANA GOMES LIMA

2010



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ANÁLISE FISIOLÓGICA DA AÇÃO DO LÁTEX DE *Euphorbia splendens* var. *hislopii* N.E.B (EUPHORBIACEAE) SOBRE *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (PULMONATA, PLANORBIDAE) INFECTADA POR *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 (TREMATODA, SCHISTOSOMATIDAE), ASSOCIADA AO TEMPO DE DEGRADAÇÃO DO LÁTEX

MARIANA GOMES LIMA

Sob a orientação do Doutor e Professor

Jairo Pinheiro da Silva

E Co-orientação da Doutora e Professora

Clélia Christina Corrêa de Mello Silva

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração de Parasitologia Veterinária

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2010

636.089696

L732a

T

Lima, Mariana Gomes, 1983 -

Análise fisiológica da ação do látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopilii* n.e.b (Euphorbiaceae) sobre *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (Pulmonata, Plarnobidae) infectada por *Schistosoma mansoni* Sambon 1907 (Trematoda, Schistosomatidae), associada ao tempo de degradação do látex /
Mariana Gomes Lima - 2010.
88 f. : il.

Orientador: Jairo Pinheiro da Silva.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
Bibliografia: f. 70 - 88.


1. Parasitologia veterinária - Teses. 2. *Biomphalaria glabrata* - Teses. 3. *Schistosoma mansoni* - Teses I. Silva, Jairo Pinheiro da, 1969 -. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

MARIANA GOMES LIMA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em Parasitologia Veterinária.

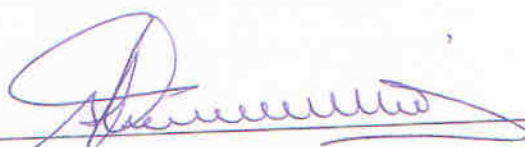
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 24/02/2010.



Jairo Pinheiro da Silva, M. sc., D. Sc., UFRRJ



Solange Viana Paschoal Blanco Brandolini, M. Sc., D. Sc, UFRRJ



Maurício Carvalho de Vasconcelos, M. Sc., D. Sc., IOC-FIOCRUZ/RJ

Dedico todas as conquistas, até
aqui feitas, ao meu querido e
amado pai.

AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho a todos que de qualquer forma contribuíram para sua realização. Esta dissertação é parte de mais uma etapa da carreira profissional que desejo seguir. E para que ela chegasse ao ponto final contei com o apoio de grandes amigos, familiares e profissionais.

Primeiramente, agradeço aos meus pais, Gelson e Maria Lúcia, pela minha formação. Ao meu querido pai, pelo esforço sem medidas para manter um lar sempre equilibrado e saudável para minha formação e de meus irmãos. À minha amada mãe, que, embora tão curta a convivência entre nós, deixou escrito tudo o que eu deveria saber sobre ela e sobre o que eu representava em sua vida. Agradeço todos os ensinamentos, falados ou escritos, de meus pais; mas acima de tudo agradeço por tudo que, silenciosamente, aprendemos juntos. Juntamente com meus pais, agradeço a toda minha família, que juntos ao meu pai, ajudaram na minha criação e formação.

Quero agradecer também a todos meus amigos, aos sempre presentes, aos que volta e meia, vem e vão, aos que estão distantes; em fim a todos que sempre me quiseram bem e aos quais os quero também. Mas, em especial, existem alguns que gostaria de citar, a minha amiga Paloma Martins, por me ajudar a amadurecer na minha profissão, pela parceria incondicional e por ter trabalhado ao lado de uma pessoa, realmente brilhante, pela qual eu tenho muito respeito e admiração. As minhas amigas, Clarisse Cavalcanti e Raffaella D'Angelo pela sinceridade em todos os momentos que precisei ouvir a verdade. Pela parceria, cumplicidade e amizade nos nossos tempos de alojamento e, por tudo o que se tornou ainda melhor depois de lá. A minha, irmã, amiga e cúmplice, Suelem Lima, por todos os momentos de baixos e altos que vivemos em nossas vidas, me sinto segura e em paz com sua amizade.

Quero dedicar um parágrafo só a ele, o meu parceiro, amigo amado, Ronaldo de Carvalho, que de maneira desprendida me ajudou durante os momentos mais difíceis e cansativos deste trabalho. Permaneceu ao meu lado durante todas as suas férias, trabalhando até a madrugada. Chegando muito antes do horário do expediente e saindo, muitas vezes, muitas horas depois. Muito obrigada pela parceria! Sem a menor sombra de dúvidas você foi essencial para que eu chegasse aqui.

Ao meu amor, Francly Lisboa, que de maneira delicada chegou a minha vida e já não me lembro como era antes de tê-lo comigo. Meu bem querer, muito obrigada, por todos os momentos, por segurar todas as situações difíceis ao meu lado e por saber que você está sempre por perto.

Aos meus queridos, amados, orientadores, Dr. Jairo Pinheiro e Dra. Clélia Christina Mello-Silva. Ao meu amado professor, por ter me recebido de forma acolhedora e amável em seu laboratório mais uma vez. Por sua paciência comigo, pela confiança, pela credibilidade, pelo carinho, e principalmente, pela amizade. Além da figura, que respeito profundamente, como profissional, e sei claramente da sua competência. Eu o admiro e respeito por sua humildade, ética, justiça, transparência e o brilhantismo no trabalho. Mas, acima de tudo, a pessoa que ele representa para mim, um homem de coração puro e cheio de luz. A minha querida orientadora, que muito me contagia com seu bom humor, entusiasmo, confiança nas pessoas e nas coisas boas. Pela sua fé em sempre acreditar em conquistar o que deseja. Não tem medo de trabalho nem do que parecer ser, ou realmente é, difícil. Muito obrigada pela confiança e por todos os conselhos.

E por fim, quero agradecer ao Dr. Maurício Vasconcellos, por ceder o espaço em seu laboratório na Fundação Instituto Oswaldo Cruz – RJ, juntamente com materiais e conhecimentos, para que este trabalho fosse realizado. A estudante de IC Aline por me auxiliar nas infecções, as técnicas do laboratório, Ana Paula e dona Jadir, pela manutenção e organização dos animais. E ao Laboratório de Esquistossomose Experimental – IOC/FIOCRUZ-RJ por todo auxílio e cooperação.

RESUMO

LIMA, Mariana Gomes. **Análise fisiológica da ação do látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopii* n.e.b (Euphorbiaceae) sobre *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (Pulmonata, Planorbidae) infectada por *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 (Trematoda, Schistosomatidae), associada ao tempo de degradação do látex.** 2010. 88p Dissertação (Mestrado em Parasitologia Veterinária, Ciências Veterinárias). Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

A Esquistossomose mansônica é uma parasitose com importância na medicina humana e veterinária, tendo o caramujo *Biomphalaria glabrata* como seu principal hospedeiro intermediário no território brasileiro, em função da sua fácil adaptabilidade e ampla distribuição geográfica. Em resposta a isso, e aos demais aspectos mundiais a Organização Mundial de Saúde incentiva a busca de moluscicidas naturais, com a finalidade de reduzir o impacto do controle destes moluscos sobre o ambiente e sobre a economia dos países afetados. O presente estudo teve como objetivo avaliar fisiologicamente a ação do látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopii* sobre *B. glabrata* infectada por *Schistosoma mansoni*, associada ao tempo de degradação do produto. Para tanto, os moluscos foram expostos à solução aquosa do látex na concentração sub-letal de 0,7 mg/l por 30 dias para análise da biologia reprodutiva. E para avaliação fisiológica foram estabelecidos experimentos complementares; o primeiro com 36 horas dividido em intervalos de 12 horas, e o segundo com 35 dias com intervalos de 7 dias. A ação do látex reduziu significativamente a produção de ovos e sua viabilidade, principalmente nos moluscos infectados. Os estoques de glicogênio, na massa cefalopodiosa e glândula digestiva, foram reduzidos nos moluscos expostos. Os níveis de glicose livre na hemolinfa apresentaram-se elevados, coincidindo com a redução dos conteúdos de glicogênio nos tecidos citados; e os de proteínas totais apresentaram diferença estatística entre os grupos expostos. Os efeitos sobre os produtos nitrogenados foram observados pela alternância das concentrações dos níveis de uréia e ácido úrico, que se apresentaram inversamente proporcionais. Somando todos estes fatores, concluiu-se que a ação do látex manteve-se ativa durante os períodos observados, resultando em alterações no processo reprodutivo e nas vias metabólicas de produção de energia e excreção. Contudo, deve-se ressaltar que a soma dos fatores de estresse, infecção e intoxicação pelo látex, culminaram em resultados significativamente diferentes, quando comparados aos moluscos somente expostos à solução. Sendo assim, sugere-se que a ação do látex possa ser mais vigorosa sobre os indivíduos infectados por larvas de *S. mansoni*.

Palavras – chave: *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni*, *Euphorbia splendens* var *hislopii*.

ABSTRACT

LIMA, Mariana Gomes. **Physiological analyses of *Euphorbia splendens* var. *hislopii* n.e.b (Euphorbiaceae) activity on *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (Pulmonata, Planorbidae) infected by *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 (Trematoda, Schistosomatidae), associate on decline life time of latex.** 2010. 88p Dissertation (Master Science in Veterinary, Science Veterinary). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

The Schistosomiasis is a parasitic diseases that have been take over importance in human and veterinary medicine. The snail *Biomphalaria glabrata* have the most important role like an intermediate host in Brazilian territory, due to its widespread geographic distribution. The World Health Organization stimulates this research of natural molluscicides, to decrease the impact of mollusk control at the environment and at the economy of the affected countries. This study aims to analyze the action of *Euphorbia splendens* var. *hislopii* latex on *B. glabrata* physiology infected by *Schistosoma mansoni* associate to time of degradation of latex. So, the mollusks were exposed to aqueous solution of latex for 30 days, and then the alterations reproductive activity was observed. To analyze the physiological changes complementary studies were established, the first study during 36 hours and were divided in three parts of 12 hours. Another study was established during 35 days with 7 interval days. The latex exposition caused a reduction the total number of the egg and your viability, especially in exposed snails. The carbohydrate content was significantly altered, the glucose levels were increased at the same time when the glycogen level was reduced in the cephalopedal mass and in the digestive gland. The total protein in the hemolymph was significantly different when we compared exposed and unexposed snails. The nitrogenous of degradation products were also analyzed. The urea and uric acid content were inversely related, when the urea content were high in other hand the uric acid were low. We concluding the latex action was active during all days observed and it results in an alteration in reproductive biology and at the metabolic path ways for energy production. By the way, the stress caused for intoxication by latex plus the infection result in more significant different changes when compared exposed and the unexposed snails. The latex action was stronger at the snails infected by larval trematodes.

Keys – words: *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni*, *Euphorbia splendens* var *hislopii*.

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO GERAL	1
2- REVISÃO DE LITERATURA	6
2.1- Aspectos Históricos da Esquistossomose	6
2.2- Caracterização do parasito <i>Schistosoma mansoni</i>	7
2.2.1- O ciclo do <i>Schistosoma mansoni</i>	8
2.3- Aspectos biológicos de <i>Biomphalaria glabrata</i>	10
2.4- Estratégias para o controle da Esquistossomose	15
2.4.1- Saneamento do Meio	16
2.4.2- Tratamento da população infectada	17
2.4.3- Educação em saúde	18
2.4.4- Controle dos moluscos hospedeiros	19
2.4.4.1- Moluscidas de origem vegetal	20
2.4.4.2 – Ação do látex de <i>Euphorbia splendens</i> var. <i>hislopii</i> em moluscos hospedeiros de parasitos de importância médico-veterinária	21
2.4.4.3- Estudos fisiológicos da ação de moluscidas naturais.....	22
2.4.4.4- Alterações fisiológicas causadas por larvas de trematódeos	23
2.4.4.4.a- Alterações no conteúdo de carboidratos	23
2.4.4.4.b- Alterações no conteúdo de proteínas totais	25
2.4.4.4.c- Alterações no conteúdo de produtos nitrogenados de excreção.....	26
3- MATERIAL E MÉTODOS	
3.1- Obtenção do látex de <i>Euphorbia splendens</i> var. <i>hislopii</i>	27
3.1a- Preparo da solução-mãe e determinação das concentrações letal e subletal do látex de <i>Euphorbia splendens</i> var. <i>hislopii</i>	27
3.1b- Análise físico-química da solução aquosa do látex	29
3.2- Criação de <i>Biomphalaria glabrata</i> em laboratório	29
3.3- Obtenção de ovos e miracídeos de <i>Schistosoma mansoni</i>	30
3.4- Infecção de <i>Biomphalaria glabrata</i> pela linhagem BH do <i>Schistosoma mansoni</i>	30

3.5- Experimento de Biologia Reprodutiva	31
3.6- Experimento de exposição de <i>Biomphalaria glabrata</i> , infectada e não infectada, por <i>Schistosoma mansoni</i> , ao látex de <i>Euphorbia splendens</i> var. <i>hislopii</i> no período de 0,5; 1,0 e 1,5 dias	32
3.7- Análises bioquímicas	33
3.8- Análises Estatísticas	33
3.9- Experimento de Exposição de <i>Biomphalaria glabrata</i> , infectada e não infectada por <i>Schistosoma mansoni</i> , ao Látex de <i>Euphorbia splendens</i> var. <i>hislopii</i> por 35 dias com intervalos de 7 dias	36
3.10- Análises Bioquímicas	36
3.11- Análises Estatísticas	37

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Análise Físico-Química da Solução Aquosa do Látex	38
4.2- Experimento de Concentração-Letal	38
4.3- Aspectos da Biologia Reprodutiva de <i>Biomphalaria glabrata</i>	39
4.4- Alterações nas reservas energéticas de <i>Biomphalaria glabrata</i> infectada por <i>Schistosoma mansoni</i> associada ao tempo de degradação do látex de <i>Euphorbia splendens</i> var. <i>hislopii</i>	46
4.4.1- Concentração de glicogênio nos tecidos de massa cefalopediosa e glândula digestiva	46
4.4.2- Concentração de glicose e proteínas totais na hemolinfa	53
4.4.3 - Concentração de ácido úrico e uréia na hemolinfa	61

5- CONCLUSÕES

5.1- Aspectos da Biologia Reprodutiva	68
5.2- Alterações nas reservas energéticas de <i>Biomphalaria glabrata</i> infectada por <i>Schistosoma mansoni</i> associada ao tempo de degradação do látex de <i>Euphorbia splendens</i> var. <i>hislopii</i>	68

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

70

7- ANEXOS

7.1- Instruções de uso GLICOSE

7.2- Instruções de uso PROTEÍNAS TOTAIS

7.3- Instruções de uso ÁCIDO ÚRICO

7.4- Instruções de uso URÉIA ENZIMÁTICA COLORIMÉTRICA

1- INTRODUÇÃO GERAL

A Esquistossomose mansônica é uma helmintose de grande importância em saúde pública. Atualmente, a Organização Mundial de Saúde (OMS) avalia o impacto da doença através do método de mensuração *Disability Adjusted Life Years* (DALY), desenvolvido pelo Banco Mundial do Desenvolvimento, em 1993, que mede a qualidade de vida das populações e não só através da morbidade e mortalidade como anteriormente. Com base no índice DALY, é esperado que o impacto da esquistossomose humana seja equiparado ao de algumas doenças infecciosas, como a tuberculose e a malária (BERGQUIST, 2002). A prevalência da doença deve-se tanto ao ambiente natural quanto ao meio social, que intervém diretamente na transmissão do *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907. Vários fatores estão ligados a manutenção do ciclo, como a presença de pessoas infectadas que contaminam os recursos hídricos com dejetos fecais, a presença dos moluscos hospedeiros intermediários (*Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), *Biomphalaria tenagophila* Orbingy, 1835 e *Biomphalaria straminea* Dunker, 1848 – no Brasil) nestes ambientes e a utilização destes locais pelo homem, seja para o lazer seja para o trabalho.

A Esquistossomose mansônica tem também relevância na área de medicina veterinária, demonstrando a importância de outros hospedeiros na manutenção do ciclo do parasito em condições naturais. Cameron *et al.* (1928) e Kuntz *et al.* (1952) verificaram que o homem não é o único hospedeiro definitivo do helminto. Encontraram cinco macacos africanos (*Cercopithecus sabeus* Linnaeus, 1758) naturalmente infectados, em zonas endêmicas de esquistossomose mansônica, na ilha de Sta. Kitts, Índias Ocidentais. Kuntz *et al.* (1952), assinalaram a presença de roedores *Gerbillus pyramidum* Geoffroy, 1825 naturalmente infectados pelo parasito, no Egito. Fenwick *et al.* (1969) descreveram a manutenção do ciclo biológico do parasito em comunidades de macacos *Papio anubis* Lesson, 1827, na ausência do homem.

O primeiro encontro de animais naturalmente parasitados pelo *S. mansoni*, no Brasil, foi relatado por Amorin *et al.* (1953), que alertaram para o possível papel de mamíferos, como reservatórios desta parasitose e a provável manutenção do ciclo paralelo desta helmintose, juntamente com o homem.

Nelson (1960) diz que a esquistossomose mansônica é uma zoonose que contém mais de um animal como hospedeiro definitivo: o homem ou outros mamíferos.

Os relatos de roedores mais frequentemente capturados com infecção natural do *S. mansoni*, em áreas endêmicas de alta e média intensidades de esquistossomose humana, tem sido verificados com as espécies *Holochilus brasiliensis* Desmarest, 1819, *Nectomys squamipes* Brants, 1827 e em menor frequência em *Oxymycterus* Waterhouse, 1837. Em 1962, Barbosa *et al.* registraram a infecção natural de bovinos por *S. mansoni*. Devido ao grande porte, um único bovino pode eliminar cem vezes mais ovos em suas fezes do que um roedor. Antunes (1971) demonstrou ser possível completar o ciclo do *S. mansoni* em roedor silvestre, usando para isto o sistema *Nectomys sp.* – *B. glabrata* – *Nectomys sp.*

No Brasil, muitos animais são transportados por áreas endêmicas, sem qualquer controle, e podem agir como disseminadores da doença. Modena *et al.* (1993) verificaram que bovinos das raças Zebu e Holstein são suscetíveis à infecção natural e são capazes de eliminar ovos viáveis para o ambiente. E de acordo com o trabalho foi sugerido que bovinos tem, potencialmente, um papel na manutenção do ciclo vital do *S. mansoni*.

Modena *et al.* (2008) fizeram um levantamento histórico dos animais silvestres e domésticos naturalmente infectados pelo *S. mansoni*, abordando a relevância da co-evolução parasito/hospedeiro que hoje desencadeia na agropecuária brasileira alguns sinais das debilidades desta relação para os bovinos. Logo, o controle desta helmintose está relacionado tanto à saúde pública quanto a medicina veterinária.

Os moluscidas, como uma das estratégias para o controle da esquistossomose, começaram a ser empregados no Brasil, em 1976, com a criação do Programa Especial para o Controle da Esquistossomose (PECE) pela Fundação Nacional de Saúde (FNS) (MACHADO, 1982). Inicialmente isto foi feito com o uso de produtos sintéticos, sendo o principal deles a Niclosamida, um sal de 2',5-dicloro-4'-nitrosalicilanilida etanolamina, fabricado com o nome comercial de Bayluscide[®], tendo sua eficácia sido anteriormente comprovada (GONNERT, 1961). A aplicação deste produto provocava a ação biocida em outros organismos não-alvos da flora e da fauna (ANDREWS *et al.*, 1983), além de causar genotoxicidade e apresentar efeito carcinogênico (VEGA *et al.*, 1988).

Em paralelo, diversas plantas foram testadas como moluscicidas naturais. Jurberg *et al.* (1989) levantaram mais de 340 espécies, destacando as famílias Euphorbiaceae e Sapindaceae como as que apresentaram maior número de espécies com potencial moluscicida eficaz. Dentre as espécies estudadas estão: *Anacardium occidentale* Linnaeus (PEREIRA & SOUZA, 1974), *Euphorbia pulcherrima* Klotzsch, 1834, *Euphorbia splendens*, *Caesalpinia peltophoroides* Benth, e *Stryphnodendron barbatiman* (Mart) (MENDES *et al.*, 1984). Destas, *E. splendens* var. *hislopii* destacou-se por sua ação moluscicida em doses menores que 0,5 mg/l, oito vezes menor do que a dose letal para peixes (VASCONCELLOS & SCHALL, 1986).

Para a seleção de plantas moluscicidas foram propostos alguns quesitos como: toxidez, disponibilidade, apresentar crescimento anual e adaptabilidade em diferentes condições locais, localização da atividade moluscicida em partes de fácil regeneração na planta, como folhas. Para a utilização do produto recomenda-se que, deve ser estocável e manter a sua viabilidade por pelo menos um ano, estabilidade física e química, valor etnobotânico e extração e aplicação fáceis, utilizando preferencialmente extratos aquosos (KLOSS & McCULLOUGH, 1982). Levando em consideração todos estes critérios, em 1998, a Fundação Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, RJ) patenteou, na área de biotecnologia, o método de coleta, forma de extração e aplicação do látex de *E. splendens* var. *hislopii* [Sin. *Euphorbia milii* Des. Moul. Var. *splendens* (Hook.) Ursch & Leandri] (Carter 1994) como moluscicida (VASCONCELLOS, 2000).

Na literatura acerca de plantas com ação moluscicida e na padronização de seu uso, preconizada pela OMS, é enfatizada a utilização de produtos que, em baixas doses, resultem em alta mortalidade de moluscos. No entanto, estudos histológicos com moluscos submetidos à ação de moluscicidas químicos ou naturais demonstraram que doses abaixo da DL_{50} podem produzir danos histológicos nos moluscos, os quais causariam alterações nas suas funções vitais ou até mesmo, dependendo do órgão afetado, a morte (PILE *et al.*, 2002; ARAÚJO *et al.*, 2002; SÃO LUIZ, 2003).

O potencial reprodutivo de *B. glabrata*, principal hospedeiro intermediário do *S. mansoni* no Brasil, está diretamente relacionado às condições ambientais (MAGALHÃES & LUCCA, 1971; KAWAZOE, 1977). Fatores de estresse fisiológico, como variação da temperatura (PIMENTEL-SOUZA *et al.*, 1990),

luminosidade (BARBOSA *et al.*, 1987), jejum (LIVINGSTONE & ZWAAN, 1983) e o parasitismo por larvas de trematódeos (LOKER & ETGES, 1979; SULLIVAN *et al.*, 1985; COOPER *et al.*, 1994; COUSIN *et al.*, 1995) têm sido registrados como elementos que exercem influência sobre a biologia reprodutiva de moluscos.

Mello-Silva *et al.* (2007) demonstraram a influência da ação do látex de *E. splendens* var. *hislopii* sobre a biologia reprodutiva de *B. glabrata*. Parâmetros relativos à fecundidade e fertilidade de moluscos expostos ao látex de *E. splendens* var. *hislopii* foram observados. Na 1ª semana após a exposição, os moluscos tratados diminuíram a produção de ovos, havendo um processo compensatório após a 4ª semana, com a produção de um maior número de ovos que os animais não expostos. O látex de *E. splendens* var. *hislopii* provocou a redução do número de caramujos eclodidos; sendo a dose sub-letal suficiente para alterar a biologia reprodutiva do molusco.

As principais reservas de carboidratos nos moluscos são glicogênio e galactogênio. As reservas de glicogênio localizam-se na musculatura, na glândula digestiva e no manto e as de galactogênio são restritas à glândula de albúmen.

As alterações no metabolismo de carboidratos nos moluscos, principalmente *B. glabrata*, tem sido estudadas, avaliando a sua relação com diferentes condições de estresse como: infecção pelo *S. mansoni*, jejum e estivação (SCWARTZ & CARTER, 1982; BECKER, 1983; BEZERRA *et al.*, 1999) e ação a moluscidas, as quais provocam mudanças nas vias metabólicas aeróbias para anaeróbias, a partir de estímulos diferenciados nas enzimas reguladoras das vias de energia. A utilização das reservas de glicogênio está associada com o consumo de glicose na hemolinfa, proporcionando a diminuição dos estoques nos tecidos. Fatores humorais presentes na hemolinfa de caramujos infectados também podem alterar o metabolismo de carboidratos (CREWS & YOSHINO, 1991).

Mudanças metabólicas sofridas por *B. glabrata* quando expostas a moluscidas naturais ou químicos também foram observadas, revelando que tanto o Bayluscide® quanto a planta *Tetrapleura tetraptera* Taub, alteram o metabolismo de carboidratos e de proteínas (ADEWUNMI *et al.*, 1988). *Biomphalaria glabrata* quando submetidos à moluscidas oriundos de plantas

do cerrado como *Stryphnodendron adstringens* (Mart) Coville, também modificaram as concentrações de glicose na hemolinfa (ALCANFOR, 2001).

A ação moluscicida sobre o metabolismo de *B. glabrata* também foi relatada por Mello-Silva *et al.* (2006b) quando submeteram os caramujos a diferentes concentrações do látex de *E. splendens* var. *hislopii*, verificando alterações em suas reservas de carboidratos em tecidos de massa cefalopediosa e glândula digestiva, além de alterações nas concentrações de glicose, proteínas e compostos nitrogenados na hemolinfa. Resultados semelhantes foram observados por Mello-Silva *et al.*, 2006a com *Solanum malacoxylon*.

Posteriormente, em 2007, novamente Mello-Silva *et al.*, verificam que a exposição de *B. glabrata* infectada por *S. mansoni* ao látex de *E. splendens* var. *hislopii*, pelo período de 24 horas, provocou alterações significativas nas concentrações de glicogênio nos tecidos (glândula digestiva e massa cefalopediosa) e de glicose na hemolinfa. Os conteúdos de glicogênio foram reduzidos ao longo do tempo de infecção em ambos os grupos de moluscos infectados (controle e expostos). Os níveis de glicose na hemolinfa tenderam a estabilidade nos dois grupos. O látex de *E. splendens* var. *hislopii* interferiu nos níveis destes polissacarídeos, degradando mais rapidamente as reservas energéticas nos moluscos infectados e expostos, principalmente a partir da 3^a e 4^a semanas de infecção. Este moluscicida pode ser utilizado como um instrumento de redução da população de moluscos, principalmente nos períodos de transmissão da doença.

As alterações no metabolismo de carboidratos e de proteínas em *B. glabrata* infectada por *S. mansoni* e exposta ao látex de *E. splendens* var. *hislopii* por 24 horas permitem inferir a importância da ação do extrato como uma forma alternativa de controle do molusco (MELLO-SILVA *et al.*, 2005).

Para evidenciar a importância do uso do látex de *E. splendens* var. *hislopii* como controle alternativo de *B. glabrata* infectada pelo *S. mansoni*, o presente trabalho propõe o estudo da ação do látex em caramujos infectados e expostos ao látex até a queda de sua atividade moluscicida, que ocorre em torno de 30 dias segundo Schall *et al.* (1998) e Vasconcellos e Amorim (2003a).

Sendo assim, o problema levantado pelo presente trabalho questionou a relação entre a ação de látex de *E. splendens* var. *hislopii* na biologia reprodutiva de *B. glabrata* não infectada e infectada por *S. mansoni* e o tempo de exposição

em condições experimentais, bem como a duração de sua atividade moluscicida nas vias metabólicas do hospedeiro intermediário.

Para tanto, a hipótese proposta no trabalho diz que a exposição de *B. glabrata*, infectada ou não infectada, à dose sub-letal do látex de *E. splendens* var. *hislopii* por diferentes períodos de tempo, poderia alterar, ou não, as suas funções fisiológicas, surtindo efeito sobre as reservas energéticas em tecidos como massa cefalopediosa e glândula digestiva; alterando as rotas de excreção de produtos nitrogenados; influenciando a atividade reprodutiva.

De modo que o objetivo geral deste trabalho foi avaliar fisiologicamente a ação do látex de *E. splendens* var. *hislopii* em *B. glabrata* infectada por *S. mansoni*, associada ao tempo de degradação do produto.

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1- Aspectos Históricos da Esquistossomose

Nos séculos XVI e XVII do Brasil colônia, a expansão da cultura canavieira seguia em ritmo expressivo, no entanto a tentativa de trabalho escravo indígena havia fracassado, pela pouca resistência física destes ao trabalho e a convivência com os “homens brancos”. Sendo assim, uma nova alternativa de mão de obra escrava foi estipulada, a negro africana. Através do tráfico de escravos africanos trazidos para as fazendas de monoculturas de cana-de-açúcar do país, vieram também os primeiros homens infectados pelo *Schistosoma mansoni*. A doença se expandiu juntamente com o deslocamento dos negros pelo país, que por sua vez acompanhava o perfil político econômico da época. De forma que nos séculos seguintes, XVIII ao XIX, com o crescimento das lavouras cafeeiras e das áreas de mineração a doença ganhava espaço dentro do país.

Com a diversidade e o crescimento econômico do país os escravos e, posteriormente, trabalhadores foram dissipando-se, e com eles, a disseminação de variadas doenças, dentre elas a esquistossomose.

As relações ecológicas mantidas entre os escravos e o meio natural eram de subsistência, de maneira que a exploração e a degradação do meio representavam sua condição de existência. Em função das grandes jornadas de trabalho e da falta de assistência básica para condições de vida, os escravos

utilizavam os recursos hídricos como forma de manter as condições mais primitivas de higiene e saúde. Com isso, o hábito de defecar nas coleções de água foi o principal fator de estabelecimento da doença.

A visão predatória e extrativista da natureza no decorrer da história eleva o número de áreas degradadas, poluídas e contaminadas, favorecendo a implantação de ciclos de parasitos silvestres, que atualmente já estão estabelecidos e continuam co-evoluindo.

A Esquistossomose mansônica no Brasil é considerada uma antroponose, pois o ciclo do parasito foi iniciado entre o homem (escravo) e os caramujos dulcícolas, tendo os primeiros relatos descritos por Pirajá da Silva (1908) na Bahia. Ao longo do tempo, outros mamíferos se adaptaram ao ciclo do parasito no Brasil.

2.2- Caracterização do parasito *Schistosoma mansoni*

Os helmintos do gênero *Schistosoma* Weinland, 1858, pertencem ao Filo Platyhelminthes, Classe Trematoda Rudolphi, 1808, Subclasse Digenea Carus, 1863 e Família Schistosomatidae. São endoparasitos obrigatórios - característica que classifica a Família que tem o sangue como biótopo - e apresentam um ciclo biológico complexo, com morfologia e hospedeiros diferentes ao longo do ciclo. Constituem um grupo zoológico de espécies inteiramente adaptadas ao parasitismo, muitas das quais tem o homem como hospedeiro habitual ou casual (REY, 2008). Os trematódeos do gênero *Schistosoma* distinguem-se dos outros Digenea por apresentarem os sexos separados, acentuado dimorfismo sexual e ao aspecto geral do corpo, alongados e com achatamento menos pronunciado (REY, 2008).

Os vermes adultos vivem no interior dos vasos sanguíneos de mamíferos. As três espécies importantes para a patologia humana (*Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum* Katsurada, 1904 e *Schistosoma haematobium* Bilharz, 1852) têm distribuição geográfica diferente, ou localizações topográficas distintas no organismo do hospedeiro definitivo, além de características morfológicas e fisiológicas peculiares (REY, 2008).

Cada espécie de *Schistosoma* possui variedades regionais, marcadas por diferenças em sua infectividade para determinadas espécies ou linhagens de moluscos hospedeiros, pelo grau de antropofilia ou de zoofilia (REY, 2008).

2.2.1- O Ciclo do *Schistosoma mansoni*

As etapas do ciclo biológico do *S. mansoni* estão sistematizadas na figura 1.

Esta espécie desenvolve sua fase adulta como parasito na luz dos vasos sanguíneos do homem e de outros mamíferos, habitando preferencialmente as vênulas do plexo hemorroidário superior; onde, as fêmeas põem seus ovos. Durante a migração no sangue portal do fígado ocorre o amadurecimento dos parasitos, que depois de adultos permanecem copulados, onde a fêmea fica alocada no canal genicóforo do macho, até o final da vida. Desde o início desta migração até a chegada ao habitat definitivo dentro do hospedeiro definitivo, as vênulas mesentéricas do intestino e reto, as fêmeas percorrem os canalículos dos vasos sanguíneos, onde depositam uma fiada de ovos. A deposição dos ovos desencadeia uma desorganização local e, pontual obstrução dos vasos, resultando na extrusão dos ovos por um processo inflamatório não hemorrágico. Durante este percurso, os ovos eliminados ainda não estão embrionados, portanto, não são diagnosticados nas fezes, quando analisadas. Ao chegarem nas vênulas mesentéricas do intestino e reto, os ovos são eliminados pelo processo, no entanto estão embrionados e já podem ser diagnosticados.

Depois de atravessarem a mucosa intestinal e serem eliminados nas fezes, os ovos, que chegam em tempo útil a alguma coleção de água doce, eclodem os miracídios. Estes nadam durante algumas horas até encontrarem os moluscos aquáticos do gênero *Biomphalaria*. A especificidade com relação ao hospedeiro é uma das principais características das associações dos trematódeos digenéticos larvais e os moluscos. A força de interação entre parasito/hospedeiro é quimiocinética. Através de substâncias, como glicoconjugados, permitem que o parasito nade até 2 m de profundidade em busca do molusco. Segundo Kalbe *et al.* (1997) e Haas *et al.* (1991), um dos fatores determinantes desta especificidade é o comportamento do miracídio que seletivamente é capaz de aderir e penetrar no molusco hospedeiro adequado.

Penetrando no tegumento e indo alojar-se em diversos tecidos do molusco, os miracídeos transformam-se em esporocistos que, por poliembrionia, geram esporocistos filhos e depois em cercárias. Várias gerações de esporocistos podem suceder-se, todas elas produzindo durante algum tempo suas cercárias.

Voltando ao meio líquido, as cercárias que são liberadas pelo molusco hospedeiro ficam nadando na água, quase sempre em direção à superfície, enquanto não têm oportunidade de entrar em contato com a pele de um hospedeiro vertebrado (homem ou outro animal suscetível), através da qual penetram ativamente. A penetração da pele do hospedeiro vertebrado pode variar de 2 a 15 minutos, durante esse processo a cercária sofre alterações morfoestruturais, como a perda da cauda, transformando-se em esquistossômulo.

Os esquistossômulos que não são destruídos na pele ganham a circulação geral e vão ter ao coração, depois aos pulmões. Nos pulmões inicia-se o mecanismo de evasão, onde os parasitos ao passarem pelos canalículos dos vasos respiratórios ficam mais alongados e perdem as lâminas superficiais do tegumento pelo atrito do movimento. Simultaneamente, há a ingestão pelo parasito de antígenos dos grupos sanguíneos e MHC de classe I e II, além da adsorção de moléculas, que serão expostas na superfície do corpo. Esse processo propicia ao parasito um estado de não reconhecimento pelo sistema “self” do sistema imune do hospedeiro definitivo. Ao saírem dos pulmões retornam à circulação sistêmica e, em seguida, ao fígado, aonde chegam guiados por mecanismos desconhecidos.

No sistema porta intra-hepático, os esquistossômulos desenvolvem-se e alcançam a fase adulta. Então, os vermes adultos acasalam-se (condição para a maturação das fêmeas) e migram para as vênulas da parede intestinal, caminhando contra a corrente sanguínea da veia porta para as veias mesentéricas (REY, 2008).

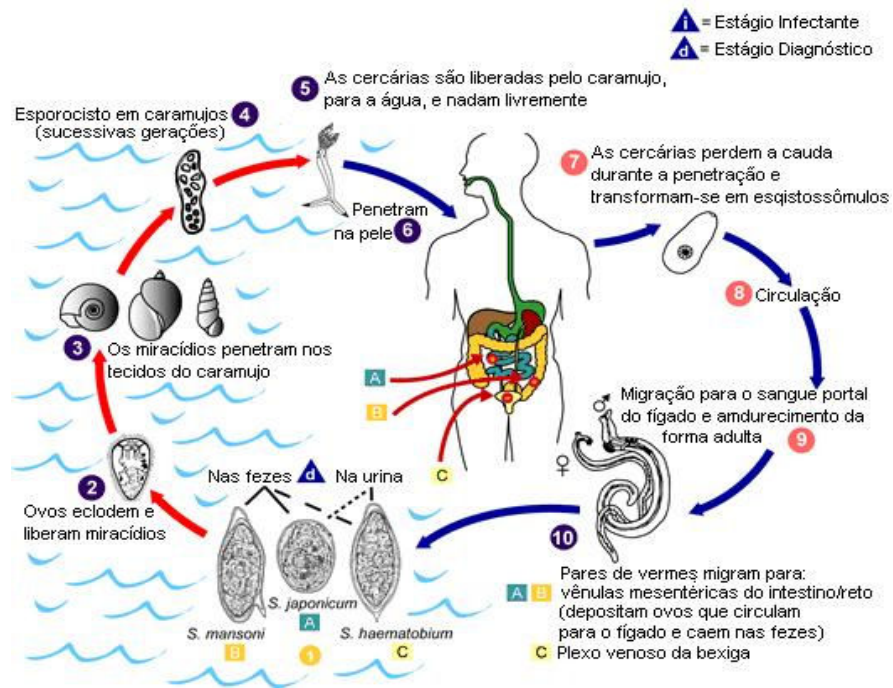


Figura 1 - Ciclo Biológico do *Schistosoma mansoni*

* adaptado do Centers for Disease Control and Prevention (CDC)

http://www.dpd.cdc.gov/DPDx/HTML/Image_Library.htm

2.3 – Aspectos Biológicos do gênero *Biomphalaria*

O molusco *B. glabrata* está situado taxonomicamente no Filo Mollusca, Classe Gastropoda, Sub-classe Pulmonata, Ordem Basommatophora, Família Planorbidae. No Brasil, o gênero *Biomphalaria* possui 11 espécies descritas, sendo elas: *B. glabrata*; *B. estramineae* Dunker, 1848; *Biomphalaria schrammi* Crosse, 1864; *Biomphalaria kuhniana* Clessin, 1883; *B. tenagophila* Orbigny, 1935; *Biomphalaria peregrina* Orbigny, 1935; *Biomphalaria intermedia* Paraense & Deslandes, 1962; *Biomphalaria amazonica* Paraense, 1966; *Biomphalaria oligoza* Paraense, 1975; *Biomphalaria occidentalis* Paraense, 1981; *Biomphalaria tenagophila guaibensis* Paraense, 1984. Das espécies citadas, apenas três são encontradas no Brasil, naturalmente infectadas pelo *S. mansoni*; são elas: *B. glabrata*; *B. straminea* e *B. tenagophila*.

Morfologicamente o gênero *Biomphalaria* apresenta concha planispiral, que varia entre 7 mm a 40 mm, *B. schrammi* e *B. glabrata*, respectivamente;

tubo renal em formato de J e hemolinfa rica em hemoglobina. Os espécimes são hermafroditas, reproduzindo-se por fecundação cruzada ou auto-fecundação. Para diferenciação das espécies os principais caracteres observados pela sistemática são: a) peculiaridades da concha, como tamanho, tipo de abertura e presença ou ausência de carenas; e b) aspectos morfológicos das partes moles como: a presença ou não de crista no tubo renal, vesícula seminal ou próstata, número de divertículos do ovoteste, aspectos da parede vaginal expandida em bolsa ou não, presença ou não de enrugamento vaginal, relação do tamanho do pênis com o prepúcio e entre o diâmetro da bainha do pênis e o canal deferente (PARAENSE, 1975).

O sistema nervoso é composto por um conjunto de gânglios e conexões nervosas localizadas atrás do saco bucal. Fisiologicamente, difere-se em três categorias de centros nervosos: sensoriais, locomotores e viscerais. O centro sensorial ou sistema nervoso central dos moluscos serve como um recurso primário de neurotransmissores como dopamina e serotonina, sua liberação é responsável pela regulação da atividade ovipositória (SANTHANAGOPALAN & YOSHINO, 2000; PARAENSE, 2001).

A circulação hemolinfática é realizada através do bombeamento do coração, constituído por um átrio e um ventrículo. A hemolinfa oxigenada chega ao coração por meio da veia pulmonar e sai pela aorta, que a distribui por todo o corpo. O soro passa pelo canal renopericárdio para ser filtrado pelo rim. Após a absorção de todos os nutrientes necessários, o restante do soro segue pelo terço final do manto para transformar-se em urina e ser eliminado pelo meato do ureter (PARAENSE, 1975).

A respiração é realizada através do saco pulmonar virtual formado pela junção da crista lateral com a crista retal, com as trocas gasosas acontecendo através do tecido conjuntivo frouxo. Já a respiração aquática é realizada pela pseudobrânquia, que são pregas tegumentares extremamente vascularizadas (PARAENSE, 1975).

Em relação à reprodução, o comportamento prevalente é a fecundação cruzada, que evolutivamente garante a manutenção da variabilidade genética por meio do fluxo gênico e da recombinação gênica (PARAENSE, 1976). Geralmente, os moluscos do gênero atingem a maturidade reprodutiva ou sexual por volta do 40º dia, mas, segundo Gault *et al.* (1992) fatores bióticos como a

infecção pelo *S. mansoni* podem alterar este início. Este começa com o amadurecimento dos ovócitos e espermátocitos no ovoteste. Os ovos encaminham-se para a encruzilhada genital, localizada na glândula de albúmen que fornece o principal recurso nutricional para o desenvolvimento dos ovos – o fluido perivitelínico, rico em galactogênio. Wijnsman & Wijck-batenburg (1987) observaram que em *B. glabrata* 36% do galactogênio é composto de L-galactose e 64% de D-galactose. Em *Lymnaea stagnalis* Linnaeus, 1758 a quantidade de galactogênio produzida é proporcional à quantidade de massa ovígera e ovos formados.

Segundo El-Saadany & Mohamed (1989) a glândula de albúmen é composta por numerosos divertículos e materiais secretórios no lúmen. São formadas de células secretórias e um tipo de célula de transporte.

Apresentam sistema digestório completo, morfológicamente se inicia na cavidade bucal, onde estão situados um par de glândulas salivares e a rádula. Esta última é constituída por dentes quitinosos, que no gênero *Biomphalaria* apresenta uma distribuição peculiar: com dente central bicúspide, dentes laterais tricúspides e dentes marginais abaixo do nível de implantação. A movimentação da rádula leva o alimento em direção ao esôfago - que contém grãos de areia que facilitam a trituração - que se liga ao estômago. Por sua vez, o estômago se comunica com a glândula digestiva, responsável pela absorção e acúmulo de reservas de energia, na forma de glicogênio. Por fim, os resíduos sólidos da digestão são conduzidos para o intestino e eliminados para o meio externo (PARAENSE, 2001).

Segundo Chiang *et al.* (1977) e Pinheiro & Amato (1994) a molécula de glicogênio é um polímero de D-glicose e possui a função de estocar glicose nos tecidos, para posteriormente ser utilizada quando necessário. Este polissacarídeo está localizado em células especiais entre os ácinos da glândula digestiva, na região anterior do manto e na massa cefalopediosa. E dependendo das condições fisio-metabólicas este polímero é degradado à glicose para suprir à necessidade energética.

No Brasil, a espécie *B. glabrata* é considerada a de maior importância em saúde pública, em função da sua ampla distribuição geográfica, capacidade de adaptação às diferentes condições ambientais, susceptibilidade à infecção pelo *S. mansoni* e capacidade de eliminação de maior número de cercárias por um

período superior a 40 dias no período patente (SOUZA & LIMA, 1990). Anatomicamente, *B. glabrata* caracteriza-se por apresentar crista renal na fase adulta e linha pigmentada ao longo do tubo renal na fase jovem, ovoteste com mais de 350 divertículos, bolsa vaginal e porção média do pênis aproximadamente do mesmo diâmetro que a porção mais larga do canal deferente (PARAENSE, 1975; PARAENSE, 2001).

Através de estudos filogenéticos, foi observado que a espécie *B. glabrata* apresenta variações intra-específicas, pois constitui espécie basal para as demais no Brasil e no continente africano. De Jong-Brink *et al.* (2001) utilizaram sequências de DNA mitocondrial de diferentes espécies de planorbídeos, a fim de analisar o grau de parentesco e explicar a extensa distribuição da esquistossomose nos continentes americano e africano. As espécies africanas são oriundas das espécies americanas, coincidindo com o encontro do fóssil mais antigo deste gênero no continente americano (MORGAN *et al.*, 2001). Através dos estudos cladísticos, verificou-se que *B. glabrata* forma um grupo monofilético com as espécies africanas.

Segundo Richards & Merritt (1972) e Richards *et al.* (1992) *B. glabrata* continua em processo de especiação, envolvendo diversos fatores como: diferenciações genéticas, cruzamentos interespecíficos observados em situações de exclusão competitiva em campo (Barbosa *et al.*, 1994) e em condições laboratoriais (Mello-Silva *et al.*, 1998) e fatores ambientais na seleção de espécies mais adaptadas ao parasitismo.

O ambiente límnic é o habitat natural do molusco *B. glabrata* e apresenta condições ecológicas para sua sobrevivência e reprodução.

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

As populações de *Biomphalaria* são instáveis e sofrem flutuações de acordo com a temperatura, sazonalidade e período de chuvas. Estes fatores climáticos interferem na dinâmica populacional destas espécies.

De acordo com Pimentel-Souza *et al.* (1990), a variação da temperatura influencia tanto na postura dos ovos quanto na eclodibilidade. Além disso,

observaram que havia alta fertilidade no intervalo de 20 a 27 °C e um decréscimo significativo a 17,5 °C. A taxa de oviposição e número de ovos por massa ovígera variaram com a luminosidade, e não, com a temperatura. O que confirma os resultados de Barbosa *et al.* (1987), que demonstraram que a iluminação e a temperatura influenciam na taxa de eclosão. De forma que, quanto maior a intensidade de luz, maior é a taxa de oviposição.

O regime de chuvas controla o potencial biótico das populações de *Biomphalaria*. Em períodos de poucas chuvas, os criadouros diminuem o seu volume e concentram a população de moluscos e o contrário resulta na distribuição destes moluscos pelo local.

A dessecação oriunda da falta de chuvas desenvolve nos moluscos aquáticos um comportamento chamado de estivação. Estimulado pela seca temporária dos habitats, os caramujos secretam uma substância mucosa na abertura das conchas. Os animais se retraem para o interior da concha, desidratam-se e as partes moles ficam reduzidas de 1/6 a 1/7 do seu volume normal, diminuindo o seu metabolismo (ROSADO *et al.* 1983), ocorre o consumo das reservas de carboidratos dos tecidos. O metabolismo de gastrópodes em estivação é parcialmente ou totalmente anaeróbio (LIVINGSTONE & ZWAAN, 1983).

A baixa tensão de oxigênio provocada pelos resíduos orgânicos frequentemente jogados neste meio e pelo aumento de produtos nitrogenados oriundos de processos de decomposição é outro fator limitante ao desenvolvimento de *B. glabrata* no meio límnic. Apesar de *B. glabrata* ser mais resistente a anoxia que os demais planorbídeos e limneídeos, apresentam comportamentos característicos quando sujeitas a este estresse biológico, sendo eles: reotaxia positiva em fluxos lentos de água, movimentação rápida em água corrente, migração para a superfície da água à noite, buscando o oxigênio do ar e tendência a emergir na lama em ambientes secos (PATIENCE *et al.* 1983). Além disso, a baixa disponibilidade de oxigênio altera a via metabólica deste organismo, após 24 horas sem oxigênio *B. glabrata* se torna um organismo anaeróbio facultativo, o que pode inibir sua capacidade ovipositória (BOYLE & YOSHINO, 2000). Como um ser anaeróbio facultativo, é capaz de sobreviver por curtos períodos em micro ambientes com pequena ou nenhuma quantidade de oxigênio, enquanto se alimenta. Podem sobreviver longos períodos em

ambientes com fluxos diferentes de oxigênio (diurnos e sazonais). Estes podem se beneficiar e beneficiar o meio com os produtos finais do metabolismo anaeróbico.

As mudanças metabólicas estão associadas às condições ambientais. O metabolismo de carboidratos é sazonalmente variável. Estas alterações são usualmente em resposta a mudanças na temperatura do ambiente e na disponibilidade de alimento e são frequentemente associadas ao ciclo reprodutivo sazonal. Os níveis de carboidratos são mais elevados no verão e outono e baixos no inverno (LIVINGSTONE & ZWAAN, 1983). Em busca da sobrevivência e da manutenção de seus descendentes, os moluscos se adaptam a estas condições, alterando seu metabolismo.

2.4- Estratégias para o Controle da Esquistossomose

A esquistossomose encontra-se entre as poucas doenças parasitárias cuja distribuição e prevalência, em escala mundial, continuam a aumentar (ANSARI, 1973; IAROTSKI *et al.* 19881; JORDAN *et al.* 1982; WHO, 1980). A razão está em que o próprio homem promove o desenvolvimento de novos e maiores focos de transmissão ao construir, sem as devidas precauções, represas e obras de irrigação exigidas pela agricultura e por extensão de novas áreas (HUNTER *et al.* 1982; REY, 1982; UPATHAM, 1974). Desta forma, os moluscos encontram muitos de seus habitats mais favoráveis, ao mesmo tempo em que aumenta o contato com as populações rurais com as águas superficiais.

Diversos programas de estudo epidemiológicos ou de ensaios de controle da esquistossomose desenvolveram-se nas últimas décadas, em várias partes do mundo, como em países da África, Oriente Médio e Ásia e particularmente no Brasil. Em muitos deles estão em curso programas de controle, visando reduzir a prevalência e a área de distribuição endêmica (ANSARI, 1973; BRASIL, 1976; FREITAS, 1972; WHO, 1980). A OMS tem participado ativamente em alguns desses programas, ou oferecido assistência para fazer avançar vários outros (THERON *et al.*, 1977).

Em linhas gerais, as estratégias básicas consistem em: reduzir consideravelmente ou impedir a transmissão do parasitismo (mediante o uso de moluscidas, saneamento ambiental, educação sanitária, etc.) e proceder com o

tratamento da população parasitada para reduzir drasticamente as fontes de infecção (REY, *et al.*, 1982; WHO, 1980).

Vários obstáculos opõem-se a uma rápida extinção das fontes de infecção, dentre os quais se destacam: casos não curados; pessoas recém-infectadas e, portanto, portadoras de formas juvenis do parasito (esquistossômulos) não suscetíveis à ação de alguns quimioterápicos; casos não diagnosticados, por diversas razões; casos que apresentam contra-indicação ao tratamento seja temporária ou definitivamente; pessoas ausentes por ocasião do diagnóstico ou do tratamento; pessoas que recusam o tratamento; presença de hospedeiros vertebrados não humanos; falhas no serviço de saúde; etc. (REY, 2008).

Por tais motivos, as medidas destinadas a reduzir ou a suprimir a transmissão deverão ser mantidas por um tempo suficientemente longo para que se possa conseguir o tratamento da totalidade dos indivíduos infectados ou re-infectados, e a exaustão das fontes de infecção por desparasitação espontânea dos pacientes não tratados (REY, 2008).

2.4.1- Saneamento do Meio

Abastecimento de água tratada, instalações e destino adequado dos esgotos são os recursos básicos de saneamento, capazes de resolver o problema da esquistossomose nas pequenas cidades ou bairros periféricos das cidades maiores. Obras de drenagem e construção de um sistema de canalização para águas pluviais podem ser também necessárias (REY, 2008).

Essas são medidas exigidas pela urbanização, independentemente da ocorrência da esquistossomose. Entretanto, mesmo nas grandes cidades, formam-se extensos bairros habitados pela população mais carente, onde faltam totalmente os benefícios do saneamento e onde, portanto, a transmissão pode efetuar-se (REY, 2008).

Nas pequenas localidades, os grandes recursos da engenharia podem ser caros para a economia local. Recomendam-se, então, construções que devem assegurar: abastecimento de água, existência de duchas e/ou lavanderias públicas que não distem muito das casas, mas afaste os moradores dos focos, destino adequado aos dejetos (construção de latrinas ou de sistemas efluentes para os esgotos, que impeçam a contaminação das águas habitadas por moluscos,

redução da superfície hídrica sujeita a infestação por moluscos e, sempre que possível, preferência pelos sistemas de irrigação com canalizações fechadas e mediante a aspersão, aterro de pequenas depressões artificiais onde as águas se acumulam; drenagem de depressões naturais, brejos e pântanos; correção do leito dos córregos, incluindo desobstrução e retificações, a fim de aumentar a velocidade de vazão para 0.5 metro/segundo ou mais; correção dos sistemas de irrigação a céu aberto; secagem periódica e remoção da vegetação que cresce nas valas; construção de pequenas pontes para travessia, sem risco, de córregos e riachos contaminados e construção de locais destinados à recreação das crianças (REY, 2008).

O abastecimento de água e a construção de chuveiros públicos tendem a afastar dos focos principalmente as mulheres que lavam roupa e seus filhos pequenos (REE, 1982). Mas não impedem que as crianças maiores e adolescentes se exponham às cercárias, quando vão brincar ou nadar em águas poluídas pelos ovos do parasito, mediante a contaminação pelas fezes do hospedeiro definitivo, freqüentemente crianças, mas em alguns ecótopos, a presença de mamíferos silvestres (REY, 2008).

2.4.2- Tratamento da População Infectada

Os medicamentos esquistossomicidas atualmente em uso caracterizam-se pela grande eficácia e reduzida toxidez. Eles podem ser utilizados em tratamentos de massa, desde que a posologia seja estabelecida em função do peso do paciente e sejam observadas as contra-indicações que limitam o uso de cada droga (BARBOSA, 1972; BRASIL, 1976; DAVIS *et al.*, 1979; GENTILINI *et al.*, 1982; KATZ, 1980; KATZ *et al.*, 1981).

Segundo Rey (2008), associada à luta contra o molusco hospedeiro e a outras medidas práticas, a quimioterapia permite reduzir drasticamente as fontes de infecção humana e limitar consideravelmente as taxas de transmissão, desde que o tratamento seja efetuado concomitantemente para todos os indivíduos que estejam eliminando ovos de *Schistosoma* e que um sistema de vigilância epidemiológica permita depois inferir rapidamente, sempre que novos casos venham aparecer. Ainda segundo o autor, para tanto, deve-se seguir três passos para que o requisito seja contemplado: (i) Tratamento dos casos positivos: feito

após inquérito parasitológico, com métodos adequados, abrangendo toda a população; (ii) Tratamento de toda a população: sem identificação dos casos positivos, após um inquérito por amostragem ter demonstrado que a proporção de indivíduos parasitados é muito alta. O limiar de positividade que justificará a quimioterapia de massa deve ser definido pela estratégia adotada para o controle; (iii) Tratamento de grupos selecionados: Comporta duas modalidades bem distintas: a) Tratamento de pessoas que eliminam uma grande quantidade de ovos, que costumam ser os indivíduos sujeitos a maior risco patogênico e, também, os maiores poluidores do ambiente; b) Tratamento restrito aos indivíduos das faixas etárias estatisticamente mais parasitadas (ou de escolares ou de outros grupos que os inquéritos preliminares demonstrarem apresentar altas prevalências), com ou sem exames parasitológicos individuais.

2.4.3- Educação em Saúde

Uma estratégia operacional capaz de adequar as recentes recomendações da OMS à situação brasileira seria incluir ações em educação em saúde dirigida para crianças em idade escolar. O pressuposto é que uma ampla cobertura das escolas de ensino fundamental, complementada pela busca ativa de crianças em idade escolar que moram nas redondezas, mas que não frequentam a escola, muito provavelmente bastaria para reduzir de maneira expressiva o número de casos da doença (WHO, 2002). Junto a isso, a Secretaria de Vigilância em Saúde recomenda aos municípios endêmicos a realização de inquéritos coproscópicos bienais de toda a população, seguido de tratamento quimioterápico dos portadores da infecção, além de medidas profiláticas como educação em saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

Somado a isso a educação em saúde deve mobilizar os moradores de zonas endêmicas para que participem ativamente dos trabalhos contra a endemia, não só facilitando a realização dos inquéritos pelos serviços de saúde, como ajudando a identificar os focos de transmissão, a combater os moluscos e a eliminar eventualmente seus criadouros (REY, 2008).

2.4.4 – Controle dos Moluscos Hospedeiros

O uso de moluscidas é a forma de controle da esquistossomose mais usual em todos os países (WEBBE, 1987). A aplicação desses produtos é conhecida desde 1913-1915, sendo que inicialmente foram empregadas várias substâncias não específicas para este fim, tais como cal, cianeto de cálcio e sulfato de cobre (DUNCAN, 1974). Os chineses foram os primeiros a utilizar fertilizantes no combate a caramujos, nas primeiras décadas do século XX. O primeiro relato da utilização destes produtos em campo foi feito por Chandler *et al.* (1920), que utilizaram sulfato de cobre para o controle de moluscos. Posteriormente, 1945-1955, devido aos soldados americanos contraírem esquistossomose durante a Segunda Guerra Mundial, foi incentivada a pesquisa nesta área, onde foram encontrados vários produtos como o Pentaclorofenato de Sódio e o Pentaclorofenol, entre 7.000 substâncias pesquisadas. Mais tarde, surgiram outros compostos dos quais se destacaram o N-Tritymorpholine, Nicotinilida e a Niclosamida (RITCHIE, 1973; WEBBE, 1987). Apesar de todas as pesquisas realizadas com vários produtos sintéticos até o momento, a Niclosamida tem sido o mais eficiente e o mais utilizado em pesquisas para o controle da esquistossomose.

No Brasil, desde a implantação do PECE, em 1976 pela FNS, este produto está sendo utilizado para áreas de baixa endemicidade (AMARAL & PORTO, 1994). A Niclosamida pode ser aplicada em campo de forma diluída no recurso hídrico, obtendo resultados satisfatórios em concentrações inferiores a de outros produtos sintéticos (McCULLOUGH *et al.*, 1992). Além disso, é utilizado como anti-helmíntico, no tratamento de cestóides de importância médico-veterinária. Estudos realizados em *B. glabrata* demonstram sua eficiência na diminuição da população destes moluscos em campo.

No entanto a preocupação com a preservação ambiental associada ao alto custo dos moluscidas sintéticos usuais vem incrementando a pesquisa de moluscidas de origem vegetal, na busca de plantas seletivas aos moluscos alvos, que não causem danos à biota, abundantes nas áreas endêmicas e de fácil extração (WEBBE *et al.*, 1983; HOSTETTMANN, 1984; McCULLOUGH, 1986).

2.4.4.1 – Moluscidas de Origem Vegetal

Juntamente com as pesquisas com produtos químicos, diversos pesquisadores buscaram em plantas de áreas endêmicas de esquistossomose, um princípio ativo eficiente no combate aos moluscos hospedeiros. De acordo com Cheng *et al.* (1971) os chineses são um dos maiores grupos neste campo, com cerca de 600 espécies de vegetais já testados, porém poucos são utilizados com frequência no controle de moluscos como parte de programas do governo.

Um dos primeiros relatos do uso de moluscidas naturais ocorreu no Sudão e se refere à espécie *Balanites aegyptiaca* (Balanitaceae) Linnaeus, 1758 e de acordo com a literatura seus frutos foram eficientes no controle de moluscos do gênero *Bulinus* e *Planorbis*, mas tóxicos para organismos não-alvos (ARCHIBALD *et al.*, 1933; WAGNER *et al.*, 1936). Em 1997, LUT *et al.* testaram o extrato de *Balanites maughamii* Sprague em *B. glabrata*, demonstrando ineficácia. Extratos aquosos de plantas chinesas *Rheum palmatum* L. e *Rheum dendatum* L. também demonstraram atividade moluscicida para *B. glabrata*, relacionando a mesma à presença de antraquinonas.

No Brasil, os primeiros estudos ocorreram em 1944 por Pinto & Almeida que utilizaram o cipó *Sejania* sp. sobre caramujos, miracídeos e cercárias de *S. mansoni*. Mais tarde, destacam-se os estudos de Amorim & Pessoa (1962), Sousa (1970), Rouquayrol *et al.* (1972, 1973) e Sousa & Rouquayrol (1974), nos quais pesquisaram plantas do nordeste brasileiro com atividade moluscicida, demonstrando apenas eficácia em 5% dos vegetais. Concomitantemente, Pereira & Souza (1974) publicaram resultados promissores quanto a utilização da casca da castanha do caju, *Anacardium occidentale* Linnaeus, 1758 no controle de caramujos na concentração de 2,8 mg/l. No entanto, em estudos posteriores, Kloos & McCullough (1982) verificaram que os produtos derivados do ácido anarcárdico, quando armazenados, poderiam apresentar efeito explosivo, tornando a utilização deste produto inviável.

Outras plantas têm sido testadas como moluscidas em *B. glabrata* sendo elas: *Jatropha curcas* L., *Byrsonima intermedia* A. Juss, *Annona crassiflora* Cardim, 1584, *Millettia thonningii* (Schum & Thonn), *Maesa lanceolata* Forssk, *Stryphnodendron polyphyllum* M. e *Stryphnodendron adstringens* (Mart) Coville. No entanto, nenhuma conseguiu resultados melhores aos encontrados

com *E. splendens* var. *hislopii*. Quanto à ação sobre a biologia dos moluscos, apenas foram observadas alterações na osmoregulação associada à ação de *M. thornningii* e no metabolismo de carboidrato e protéico observado para as duas últimas (RUG & RUPPEL, 2000; ALVES *et al.*, 2000; SANTOS & SANTANA, 2001; LYDDIARD & WHITFIELD, 2001; APERS *et al.*, 2001; BEZERRA *et al.*, 2002).

Em 1998, o IOC-FIOCRUZ/RJ patenteou a metodologia de coleta, extração e aplicação do látex de *E. splendens* var. *hislopii* como moluscicida (VASCONCELLOS, 2000), sendo considerado o mais promissor, segundo a OMS para o controle de hospedeiros intermediários de *S. mansoni* no Brasil.

2.4.4.2 - Ação do látex de *Euphorbia splendens* em Moluscos Hospedeiros de Parasitos de Importância Médico-Veterinária

Estudos sobre a ação deste látex em moluscos hospedeiros intermediários do *S. mansoni*, *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) e *Paragonimus westermani* (Kerbert, 1878) foram realizados, obtendo resultados interessantes em relação à concentração letal (CL₉₀), sendo eles: 0,45 a 4,04 mg/l para as espécies de *Biomphalaria*, 0,55 mg/l a 1,51 mg/l para *Lymnaea columella* (Say, 1817) e 6,22 mg/l para *Melanooides tuberculata* (Müller, 1774) em testes laboratoriais (VASCONCELLOS & SCHALL, 1986; GIOVANELLI *et al.*, 1999; VASCONCELLOS & AMORIM, 2003a). Em situações de campo, o látex foi testado em ambientes lênticos e lóticos em *B. glabrata*, respectivamente, em concentrações entre 5 a 12 mg/l (MENDES *et al.*, 1992; 1997; BAPTISTA *et al.*, 1992) e em *L. columella* na concentração de 5mg/l (VASCONCELLOS & AMORIM, 2003b).

Quanto à ação do látex de *E. splendens* em massas ovíferas de *B. glabrata* e sobre as formas evolutivas, miracídio e cercária de *S. mansoni* observou-se uma concentração letal (CL₉₀) muito maior do que a aplicada para moluscos, De Carvalho *et al.* (1998) observaram que em concentrações do látex na faixa de 10-100mg/l, não foram obtidos resultados satisfatórios. Estes autores verificaram que a concentração letal para ovos foi de 870mg/l. Já Schall *et al.* (1998) observaram Cl₉₀ de 1200 ppm.

A avaliação das propriedades moluscidas de *E. splendens var. hislopii* em *B. glabrata* foi realizada por Zani *et al.* (1989, 1993) e Mendes *et al.* (1997), evidenciando que as miliaminas constituem o princípio ativo relacionado a esta atividade. A miliamina L testada foi cerca de 100 vezes mais eficiente que a niclosamida.

Alterações causadas pelo látex de *E. splendens var. hislopii* sobre a biologia de *B. glabrata* foram sugeridas por Mendes *et al.* (1992), relacionando a causa da morte com a repentina interrupção de impulsos nervosos, associada à ação anti-colinesterásica. No entanto, pouco se sabe sobre as possíveis alterações em demais sistemas dos moluscos.

2.4.4.3 - Estudos Fisiológicos da Ação de Moluscidas Naturais

Em 1988, Adewunmi *et al.* verificaram que tanto o Bayluscide quanto a planta *T. tetraptera* Taub reduziram os conteúdos de carboidratos e proteínas nos tecidos de massa cefalopediosa e glândula digestiva de *B. glabrata*. Alcanfor (2001) verificou a diminuição dos conteúdos de glicose e proteína na hemolinfa de *B. glabrata* submetida ao tratamento com o extrato da folha e da casca de *Stryphnodendron adstringens*, *S. polyphyllum* e nos extratos da folha e da casca de *Caryocar brasiliense*, plantas do cerrado brasileiro. Foram observadas alterações histológicas em *B. glabrata* exposta a estes extratos, verificando degeneração da glândula digestiva, mas não o suficiente para aumentar significativamente os níveis de proteína totais na hemolinfa.

Mas adiante em 2006, Mello-Silva *et al.* verificam alterações fisiológicas em *B. glabrata* tratada com extrato de *Solanum malacoxylon*, neste estudo foi constatado que o extrato reduziu os níveis de glicose na corrente hemolinfática, com quebra de moléculas de glicogênio nos tecidos de massa cefalopediosa e glândula digestiva, a fim de estabilizar os níveis de glicose. Os moluscos tratados com extrato bruto de *S. malacoxylon* aumentaram a concentração de proteínas na hemolinfa, causando alterações na concentração dos produtos nitrogenados.

Ainda em 2006, Mello-Silva *et al.* analisaram as mudanças na fisiologia de *B. glabrata* desencadeadas pelas concentrações letal e sub-letal do látex de *E. splendens var. hislopii*. E verificam que os depósitos de glicogênio na glândula

digestiva apresentaram diferença significativa e uma relação negativa em função do aumento da concentração do látex. Já no tecido de massa cefalopédica esta relação foi positiva e também com diferença significativa entre as concentrações. Os níveis de glicose foram reduzidos conforme o aumento da concentração do látex, ao contrário das concentrações de proteínas, que aumentaram na hemolinfa em função do aumento da concentração do látex, mantendo uma relação positiva. De modo que, a degradação das proteínas resulta em mudanças nas concentrações de produtos nitrogenados, como a uréia, que teve a sua concentração reduzida de acordo com o aumento da concentração do látex utilizada.

A ação do látex de *E. splendens* var. *hislopii* sobre *B. glabrata* também resulta em alterações na atividade reprodutiva do molusco. Com redução do número de ovos por massa ovígera, bem como no número de ovos por molusco e número de massa por molusco (MELLO-SILVA *et al.*, 2007)

Em 2008, Subhash *et al.* relataram as alterações na fisiologia de *B. glabrata* e os efeitos moluscicidas do látex bruto e processado de *E. milii*. Os moluscos submetidos aos diferentes tratamentos apresentaram comportamento de retração para o interior da concha e perda de apetite, alterações fisiológicas e retardo do crescimento.

2.4.4.4- Alterações Fisiológicas Causadas por Larvas de Trematódeos

Em 1980, Becker afirmou que ao invadir o hospedeiro invertebrado, as larvas de trematódeos causam danos pela retirada de substâncias, as quais seriam utilizadas como nutrientes pelo molusco e são drenadas pelas larvas. O autor compara esse déficit aos danos causados por um estado de jejum severo. Somado a esses fatos a retirada de substratos perturba a manutenção do metabolismo basal do molusco, além de interferirem nos processos de crescimento e reprodução.

2.4.4.4.a – Alterações no conteúdo de carboidratos

O metabolismo energético dos gastrópodes pulmonados é baseado em moléculas de polissacarídeos (JOOSSE, 1988; JOOSSE & van ELK, 1986). As

principais e mais abundantes moléculas encontradas nos moluscos são o glicogênio e o galactogênio (GERAERTS, 1992). O glicogênio é armazenado na região anterior do manto, entre os ácinos da glândula digestiva e gônada (de JONG-BRINK, 1973; MUELEMAN, 1972; SMINIA, 1972; CHIANG, 1977) e na massa cefalopediosa (LIVINGSTONE & ZWAAN, 1983; PINHEIRO & AMATO, 1994).

A principal região para o estabelecimento e desenvolvimento das larvas de trematódeos é a glândula digestiva. De acordo com Cheng (1963), as larvas causam bloqueio na circulação da glândula estabelecendo uma situação de anaerobiose. Além disso, a mobilização dos nutrientes e metabólitos pelos parasitos também podem afetar a respiração celular nos tecidos do hospedeiro.

Existem inúmeras formas pelas quais o parasitismo pode afetar diferentes hospedeiros. No modelo *B. glabrata* e *S. mansoni* foi observada uma redução significativa do conteúdo de D-glicose na hemolinfa de *B. glabrata*, na terceira semana de infecção com *S. mansoni* (CHENG & LEE, 1971).

No sistema *Fasciola hepatica* /*Lymnaea truncatula* foi verificada a queda no conteúdo de glicogênio nos tecidos do hospedeiro infectado, enquanto havia um aumento no depósitos de lipídeos neutros (IAVORSKII, 1989).

Em 1994, PINHEIRO & AMATO realizaram um estudo sobre o modelo *Bradybaena similis* (Férussac, 1821) infectados com larvas de *Eurytrema coelomaticum* (Giard et Billet, 1892) Looss, 1907 e observaram acentuada redução no conteúdo de glicose da hemolinfa do molusco parasitado. Que coincidiu com a redução nos depósitos de carboidratos da massa cefalopediosa e da glândula digestiva. Assim, os autores propuseram que os esporocistos que ficam aderidos à superfície externa da glândula digestiva do hospedeiro são banhados pela hemolinfa, de onde retiram os monômeros de glicose necessários para a manutenção e desenvolvimento larval intramolusco. O desequilíbrio causado na composição glicídica da hemolinfa leva o molusco a dispor de suas reservas de carboidratos, o que causa a depleção de seus estoques de glicogênio.

Nos moluscos pulmonados adultos, o galactogênio está restrito á glândula de albúmen e aos ovos, servindo como fonte energética no processo reprodutivo. Quando o hospedeiro está parasitado por larvas de trematódeos ocorrem alterações no funcionamento da glândula. Em 1981, van Elk & Jooose constataram que em *L. stagnalis* infectada com *Trichobilharzia ocellata* (La

Vallete, 1855) havia uma significativa redução da atividade catalítica da UDP-galactose 4-epimerase, em comparação com o controle. Sendo observada uma significativa redução no peso desta glândula e nenhuma atividade ovipositória ao longo de todo período da infecção. Mais adiante, em 1988, em um estudo *in vitro* realizado por Joosse *et al.* foi verificado que a atividade sintética da glândula de albúmen de *L. stagnalis* incubadas em presença de hemolinfa de moluscos infectados com *T. ocellata* foi significativamente reduzida a um valor de cerca 50% menor do que aquele encontrado em animais do grupo controle após uma hora de incubação.

Em 1989, El-Saadany & Mohamed constataram a existência de células secretoras na glândula de albúmen, e verificaram que em *B. glabrata* infectada com *S. mansoni*, alterações na função secretora só foram significativas no período da emergência das cercárias. No ano de 1990, Crews & Yoshino utilizaram o mesmo modelo parasitológico, mas não constataram alterações significativas na síntese de polissacarídeos e, especificamente, de galactogênio quando analisados *in vivo*.

As interações fisiológicas entre *E. paraensei* Lie & Basch, 1967 e *L. columella* foram estudadas por Pinheiro *et al.* (2009), e verificaram que os conteúdos de carboidratos contidos na glândula digestiva do molusco hospedeiro apresentaram uma queda após 20 dias de infecção. Até o fim do período estudado, houve uma redução de 60% nos estoques de glicogênio quando comparados com os moluscos não infectados.

2.4.4.4.b- Alterações no conteúdo de proteínas totais

As larvas em desenvolvimento no interior do organismo do molusco hospedeiro causam contínua drenagem dos depósitos de carboidratos, o que resulta num estado de inanição. Toda essa situação leva o organismo do animal a optar por substratos alternativos para obter energia suficiente para manutenção dos seus processos metabólicos vitais. Que, segundo Becker (1980), gera alterações no conteúdo de proteínas e aminoácidos livres no molusco infectado.

No sistema *B. alexandrina/S. liei* o metabolismo do molusco foi alterado, ocorrendo significativa redução do conteúdo de proteínas, os resultados sugerem a ocorrência de lesões nos tecidos do molusco em função da ação das larvas. Em

2002, Mahmaoud *et al.* ressaltaram que as alterações mais significativas foram observados aos 20 dias de infecção, período do estágio larval de rédia, que apresenta abertura oral, sendo capaz de causar lesões mecânicas aos tecidos.

No modelo *E. paraensei/L. columella* estudado por Pinheiro *et al.* (2009) os níveis de proteínas totais circulantes apresentaram uma redução de 80% e de 76,42% na glândula digestiva.

2.4.4.4.c- Alterações no conteúdo de produtos nitrogenados de excreção

As vias metabólicas alternativas ativadas em função do parasitismo resultam em vias de excreção consequentes, as quais podem ser tóxicas ao molusco e por isso precisam de detoxificação. Uma dessas conseqüências é a elevação dos conteúdos dos produtos nitrogenados de degradação, como a uréia, ácido úrico, amônia, tudo isso em resultado a extensa degradação de proteínas e aminoácidos.

Alterações surgidas no molusco parasitado por larvas de trematódeos são homólogas às surgidas em consequência de um período de jejum severo, sendo trinta dias de infecção equivalente a seis dias de jejum (BECKER, 1980). Em 1983, o mesmo autor analisou as alterações surgidas no metabolismo de purinas em *B. glabrata* infectada por *S. mansoni* e observou que durante a infecção do molusco, o conteúdo de ácido úrico nos seus tecidos foi maior do que nos moluscos não infectados até 40 dias de infecção, reduzindo deste período em diante.

No sistema *B. similaris/E. coelomaticum* foi observada uma redução acentuada no conteúdo de uréia na hemolinfa do molusco ao longo 30 dias de infecção, alcançando 80% de redução. A variação de ácido úrico foi significativa apenas aos 25 dias de infecção, quando aumentou 47% em relação ao controle (SOUZA *et al.* 2000).

Na interação *E. paraensei/L. columella* os níveis de uréia obtiveram um aumento significativo tanto na corrente hemolinfática quanto na glândula digestiva. Neste caso, a maior concentração foi detectada 10 dias pós-infecção, com queda posterior até o fim do período pré-patente. Na glândula digestiva dos moluscos infectados os níveis de uréia foram significativamente maiores do que os não infectados, após 20 dias de infecção. O conteúdo de ácido úrico foi

reduzido em 94,72% na hemolinfa e em 43,75% na glândula digestiva, após 10 dias de infecção (PINHEIRO *et al.*, 2009).

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Obtenção do látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopii*.

As amostras do látex de *E. splendens* var. *hislopii* foram coletadas de plantas cultivadas em canteiros situados próximos ao Pavilhão Lauro Travassos, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, RJ, Brasil (Figura 02 A). Mantendo o mesmo padrão coleta, extração e aplicação de trabalhos anteriores que utilizaram o látex de *E. splendens* var. *hislopii* como moluscicida.

A coleta do látex foi realizada através de um corte transversal, no mesmo dia em que os testes foram feitos, cerca de 10 cm abaixo do meristema apical de cada galho; o látex bruto foi coletado em recipiente de vidro para evitar a coagulação e transportado para o laboratório (Figura 02 B).



Figura 02 – A – Exemplar de *Euphorbia splendens* var. *hislopii* no campus da FIOCRUZ/RJ; B – Corte transversal para extração do látex.

3.1 a- Preparo da Solução-Mãe e Determinação das concentrações letal e sub-letal do látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopii*.

Utilizando o látex recém-colhido foi preparada uma solução-mãe aquosa, na concentração de 100mg/l, e partir desta, foram preparadas soluções de diferentes concentrações para utilização nos bioensaios (Figura 03). Para o preparo da solução mãe, 1 ml do látex *in natura* foi colocado em um balão volumétrico de 1 L, posteriormente completado com água destilada. Resultando em uma solução com a concentração de 100 mg/l ou 1000 ppm. Uma amostra da solução foi submetida a análises físico-químicas.



Figura 03 – Recipiente contendo látex bruto recém colhido e solução-mãe do látex de *Ephorbia splendens* var. *hislopilii*.

As concentrações testadas foram: 0,7; 0,8; 1,0; 1,2 μ l. Para todas as diluições foram utilizados balões volumétricos de 1000 ml e o volume de cada solução foi dividido em béqueres de 500 ml. Foram colocados, em cada recipiente, 10 exemplares de *B. glabrata* (linhagem BH), medindo 8-12 mm de diâmetro de concha, para cada concentração, sendo expostos a esta solução por 24 horas, seguindo metodologia de Vasconcellos & Amorim, 2003. Dois béqueres receberam 500 ml de água destilada, onde foram colocados 10 moluscos, em cada béquer, sem látex e utilizados como grupo controle. Durante este período todos os moluscos foram mantidos em jejum (Figura 04).

Após o período de exposição ao látex, os moluscos foram retirados dos frascos e lavados com água destilada para remoção de resíduos da solução e o número de mortos foi anotado. Os caramujos que escaparam das soluções, em cada concentração, foram separados em copos de vidro contendo 50 ml de água destilada. Os moluscos que permaneceram nas soluções, durante a exposição foram colocados em recipientes contendo 500 ml de água destilada, por 24 horas. Durante o período de recuperação, os moluscos foram alimentados com pedaços de folhas de alface frescas (*Lactuca sativa* L.).

Durante o período dos bioensaios foram verificadas a temperatura ($^{\circ}$ C) das soluções e do ambiente, assim como a umidade relativa do ar (UR %).

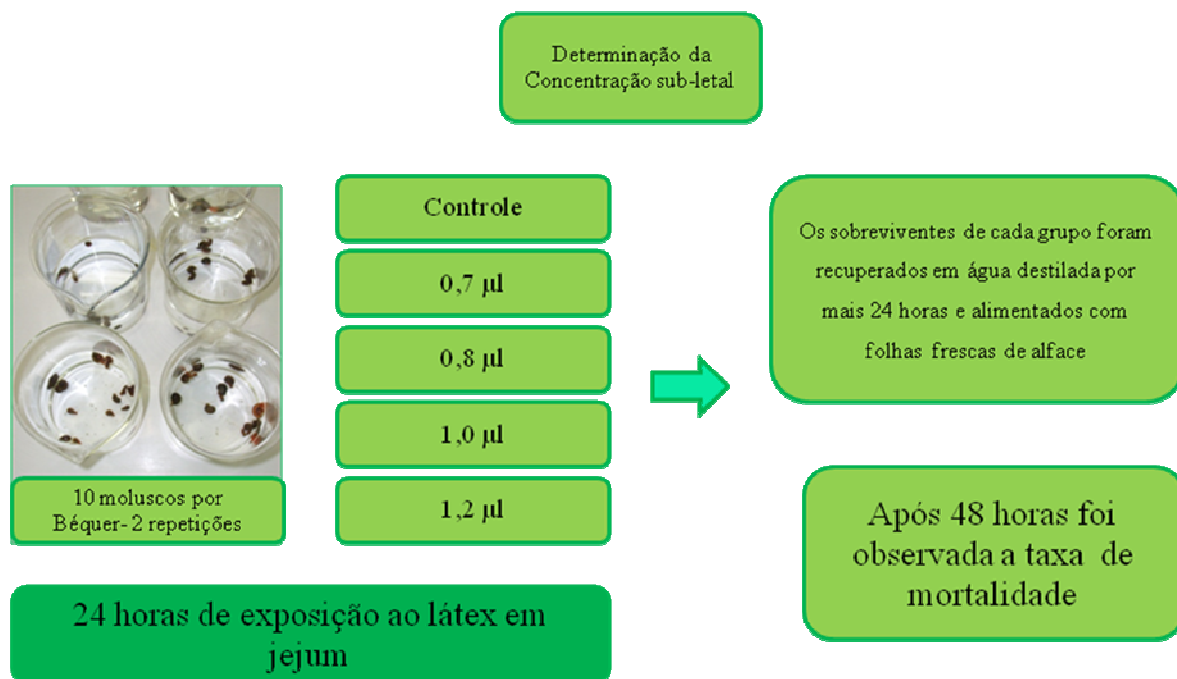


Figura 04 – Esquema de organização para determinação da concentração sub-letal (Cl_{50}).

3.1b- Análise Físico-Química da Solução Aquosa do Látex

De acordo com a metodologia recomendada pela Feema (1979) alguns parâmetros físico-químicos devem ser analisados, como a condutividade ($\mu\text{mho/cm}$), alcalinidade (mg/l CaCO_3), concentração de cloro (mg/l Cl^-), dureza de cálcio (mg/l) e o pH da solução-mãe (100 mg/l) do látex de *E. splendens* var. *hislopilii* usada para estabelecer a concentração letal.

3.2 - Criação de *Biomphalaria glabrata* em laboratório

Exemplares de *B. glabrata* (linhagem procedente de Belo Horizonte – linhagem BH), mantidas no Laboratório de Helminologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, RJ, Brasil foram utilizadas neste experimento. Os caramujos foram acondicionados em aquários de polietileno de 30 litros de capacidade, com água desclorada, obtida por decantação no Laboratório de Esquistossomose Experimental – FIOCRUZ/RJ. A temperatura média da água era em torno de $28,5 \pm 1^\circ\text{C}$ e a umidade relativa do ar variando entre 70 a 78% do início ao término do experimento. Condições já estabelecidas nas colônias mantidas em Laboratório de Esquistossomose Experimental – FIOCRUZ/RJ. Três vezes por semana os aquários foram limpos e os caramujos alimentados *ad libitum* com folhas frescas de alface.

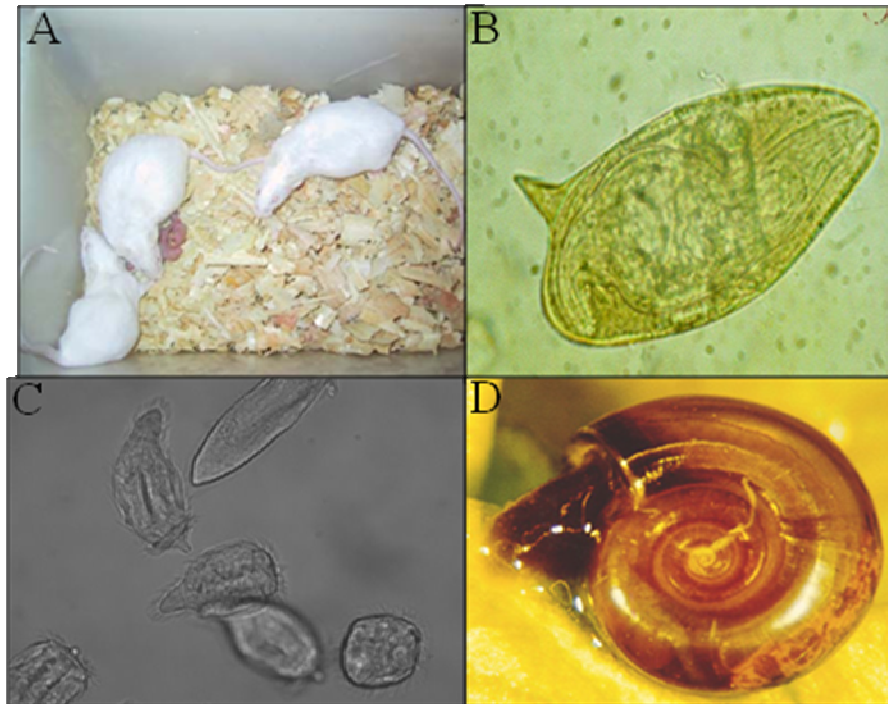
3.3- Obtenção de ovos e miracídios de *Schistosoma mansoni*

Para manutenção do ciclo de *S. mansoni* foram utilizados camundongos Swiss Webster albinos como hospedeiro definitivo (Figura 05A), no Laboratório de Esquistossomose Experimental – FIOCRUZ/RJ. Este procedimento seguiu o mesmo já descrito por Mello-Silva (1996).

3.4- Infecção de *Biomphalaria glabrata* pela linhagem BH do *Schistosoma mansoni*

Os exemplares de *B. glabrata* (BH) foram expostos individualmente a 6-8 miracídios de *S. mansoni*, linhagem BH, por caramujo (Figura 05 D e C).

As infecções foram realizadas no Laboratório de Esquistossomose Experimental – FIOCRUZ/RJ, seguindo as normas de biossegurança estabelecidas pela Instituição – na qual o Laboratório enquadra-se na classe 3 de Risco Biológico, com local e equipamentos próprios para manipulação do material, bem como o descarte em sacos de lixos específicos para estes; assim como o tratamento prévio das soluções resultantes antes do descarte. Todas as medidas relacionadas ao descarte e ao comportamento em função da manipulação destes materiais estão preconizadas em protocolos previamente estabelecidos e administrados pela Instituição.



A – Camundongos Swiss; B - Ovo de *Schistosoma mansoni*; C – Miracídeos de *Schistosoma mansoni*; D – *Biomphalaria glabrata*.

Figura 05: Obtenção de ovos e miracídeos de *Schistosoma mansoni* e infecção de *Biomphalaria glabrata* pela linhagem BH do *Schistosoma mansoni*.

3.5- Experimento de Biologia Reprodutiva

Após o bioensaio para determinação da CI_{50} os exemplares de *B. glabrata* foram organizados em 4 grupos: Infectados expostos ao látex; Infectados não expostos ao látex (controle positivo); Não infectados expostos ao látex e Não infectados não expostos ao látex (controle negativo). Cada grupo contendo 115 caramujos e cada qual com 1 repetição, resultando num total de 230 caramujos por grupo (Figura 06).

Após a divisão dos grupos os tratamentos foram estabelecidos, os animais foram acondicionados em béqueres de 500 ml, vedados com tampas de isopor vazadas (para evitar o escape da solução), e alimentados *ad libitum* com folhas de alface (Figura 6A).

Durante 30 dias os animais foram mantidos em solução, sendo que esta era filtrada diariamente para minimizar a ação dos dejetos e retirada do alimento não consumido (Figura 06 B). Assim como a filtragem da solução, a observação da oviposição e contagem de número de massas ovíferas e de ovos por massa foi diária (Figura 06 C).

As massas ovíferas foram contadas e os números de ovos verificados, bem como a viabilidade dos mesmos; sendo classificados em férteis e inférteis

Todos os dias os caramujos mortos eram contabilizados e a mortalidade foi determinada a partir da parada dos batimentos da cavidade cardíaca com a utilização de microscópio eletrônico.

Comportamentos como retração para o interior da concha, produção excessiva de muco e extravasamento de hemolinfa foram verificados.

O experimento foi encerrado quando o último indivíduo, infectado ou não, submetido ao látex morreu.

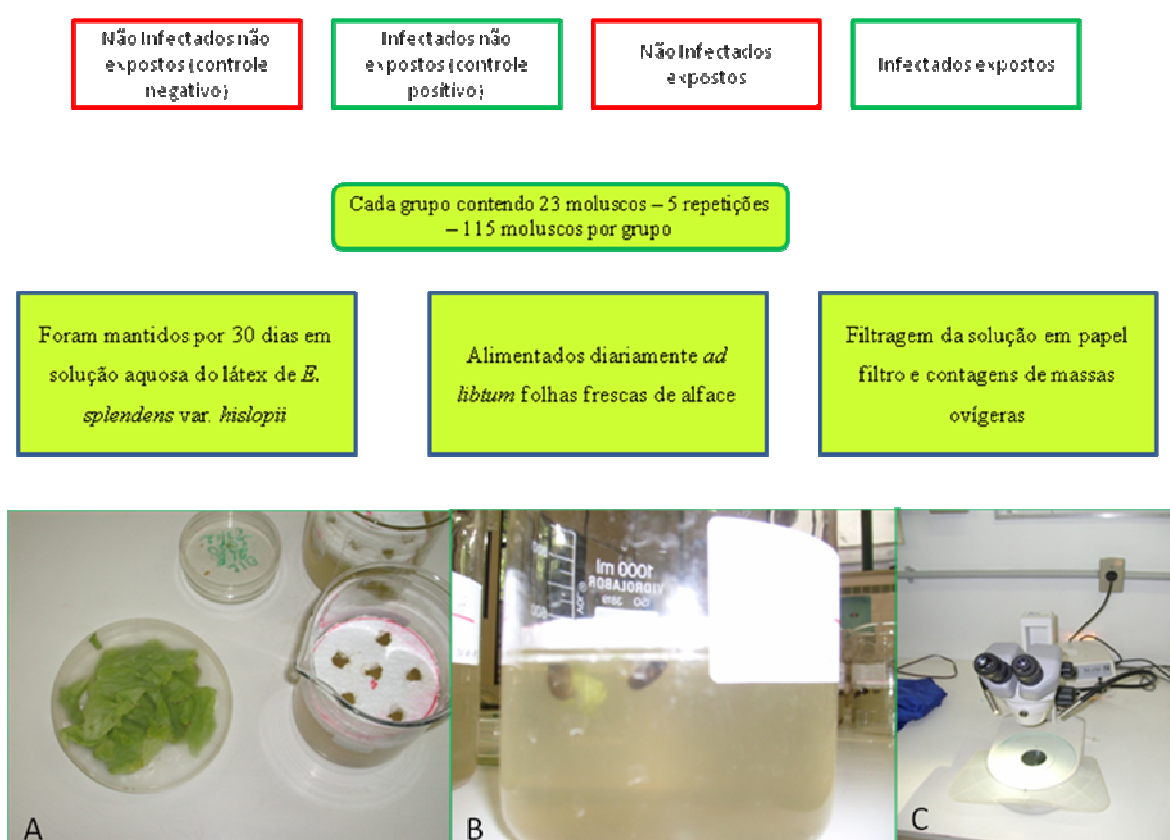


Figura 06 – Esquema de organização e desenvolvimento do experimento de biologia reprodutiva

3.6 – Experimento de exposição de *Biomphalaria glabrata*, infectada e não infectada, por *Schistosoma mansoni*, ao látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopii* no período de 0,5; 1,0 e 1,5 dias

Após a determinação da CI_{50} os exemplares de *B. glabrata* foram organizados em 4 grupos: Infectados expostos ao látex; Infectados não expostos ao látex (controle positivo); Não infectados expostos ao látex e Não infectados

não expostos ao látex (controle negativo). Cada grupo contendo 30 caramujos e cada qual com 1 repetição, resultando num total de 60 caramujos por grupo. Os caramujos foram infectados individualmente, com 6-8 miracídios.(Esquema geral do experimento – Figura 11)

A exposição ao látex foi feita 24 horas após a infecção, onde os indivíduos permaneceram por 1,5 dia (ou 36 horas) em solução (concentração de 0,7 ppm). A cada 12 horas os grupos foram dissecados para as análises bioquímicas (Figuras 07, 08, 09 e 10).

Nos períodos acima descritos, após a exposição, foi extraída a hemolinfa através de punção da cavidade pericárdica com a utilização de seringas de glicose e os moluscos foram dissecados, a glândula digestiva e a massa cefalopédica foram separadas para extração e dosagem de glicogênio. Todos os materiais biológicos coletados foram mantidos em banho de gelo durante a sua coleta e armazenados a -10°C até sua utilização.

3.7- Análises bioquímicas

Foi determinada a concentração de glicose, ácido úrico, uréia e proteínas totais na hemolinfa de *B. glabrata*, infectada e não infectada, expostas ao látex de *E. splendens* var. *hislopii* e expressas em mg/dl. Para as determinações foram utilizados kits de diagnóstico laboratorial Katal Reagentes[®].

A extração de glicogênio da glândula digestiva e massa cefalopédica seguiram a técnica descrita por PINHEIRO & GOMES (1994).

As concentrações de glicogênio foram determinadas através da reação do 3,5 dinitro salicilato (DNS) (SUMNER, 1924) e expressas em mg de glicose/g de tecido, peso fresco.

3.8 – Análises Estatísticas

Os resultados obtidos nas determinações bioquímicas foram expressos através de média \pm desvio-padrão e submetidos ao teste de análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey-Kramer e ao teste t de Student para dados não pareados para comparação das médias ($\alpha=5\%$).



Figura 07 – Grupos de *Biomphalaria glabrata*, infectada e não infectada por *Schistosoma mansoni*, exposta ao látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopii* por 0,5 dia.

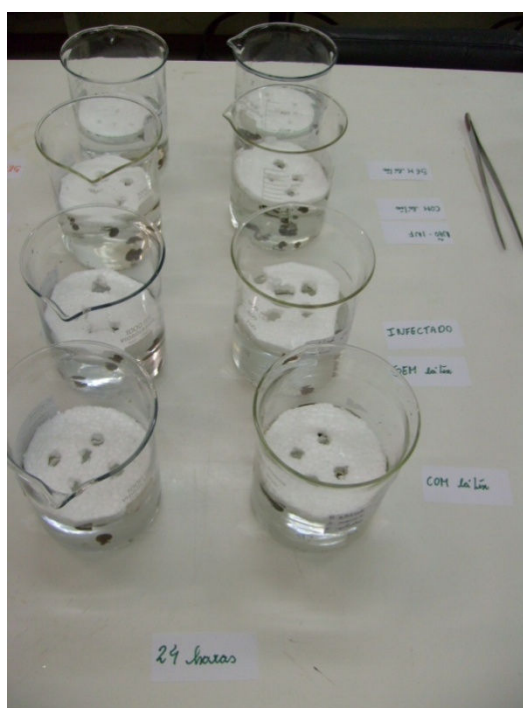


Figura 08 – Grupos de *Biomphalaria glabrata*, infectada e não infectada por *Schistosoma mansoni*, exposta ao látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopii* por 1,0 dia.



Figura 09 – Grupos de *Biomphalaria glabrata*, infectada e não infectada por *Schistosoma mansoni*, exposta ao látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopii* por 1,5 dia.



Figura 10 – Dissecção dos grupos de *Biomphalaria glabrata*, infectada e não infectada por *Schistosoma mansoni*, exposta ao látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopii* no período de 1,5 dia.

3.9 – Experimento de Exposição de *Biomphalaria glabrata*, infectada e não infectada por *Schistosoma mansoni*, ao Látex de *E. splendens* var. *hislopii* por 35 dias com intervalos de 7 dias

O látex foi coletado no *campus* da FIOCRUZ/RJ seguido do preparo da solução-mãe, que ficou acondicionado em balão volumétrico de 1L e armazenado em geladeira com temperatura e umidade relativa constantes, 5 °C e 50%, respectivamente.

Com a CI_{50} já determinada, os exemplares de *B. glabrata* foram organizados em 4 grupos: Infectados expostos ao látex; Infectados não expostos ao látex (controle positivo); Não infectados expostos ao látex e Não infectados não expostos ao látex (controle negativo). Cada grupo contendo 30 caramujos e cada qual com 1 repetição, resultando num total de 60 caramujos por grupo. Os caramujos foram infectados individualmente, com 6-8 miracídios.

Após 7 dias do preparo da solução mãe os caramujos foram expostos por 24 horas à solução aquosa do látex. Esse procedimento foi repetido a cada 7 dias até completar 35 dias. Ao completar 24 horas os animais foram retirados das soluções e dissecados para as análises bioquímicas.(Esquema geral do experimento – Figura 11)

Nos períodos acima descritos, após a exposição, foi extraída a hemolinfa através de punção da cavidade pericárdica e os moluscos foram dissecados, a glândula digestiva e a massa cefalopediosa foram separadas para extração e dosagem de glicogênio. Todos os materiais biológicos coletados foram mantidos em banho de gelo durante a sua coleta e armazenados a -10°C até sua utilização.

3.10 - Análises Bioquímicas

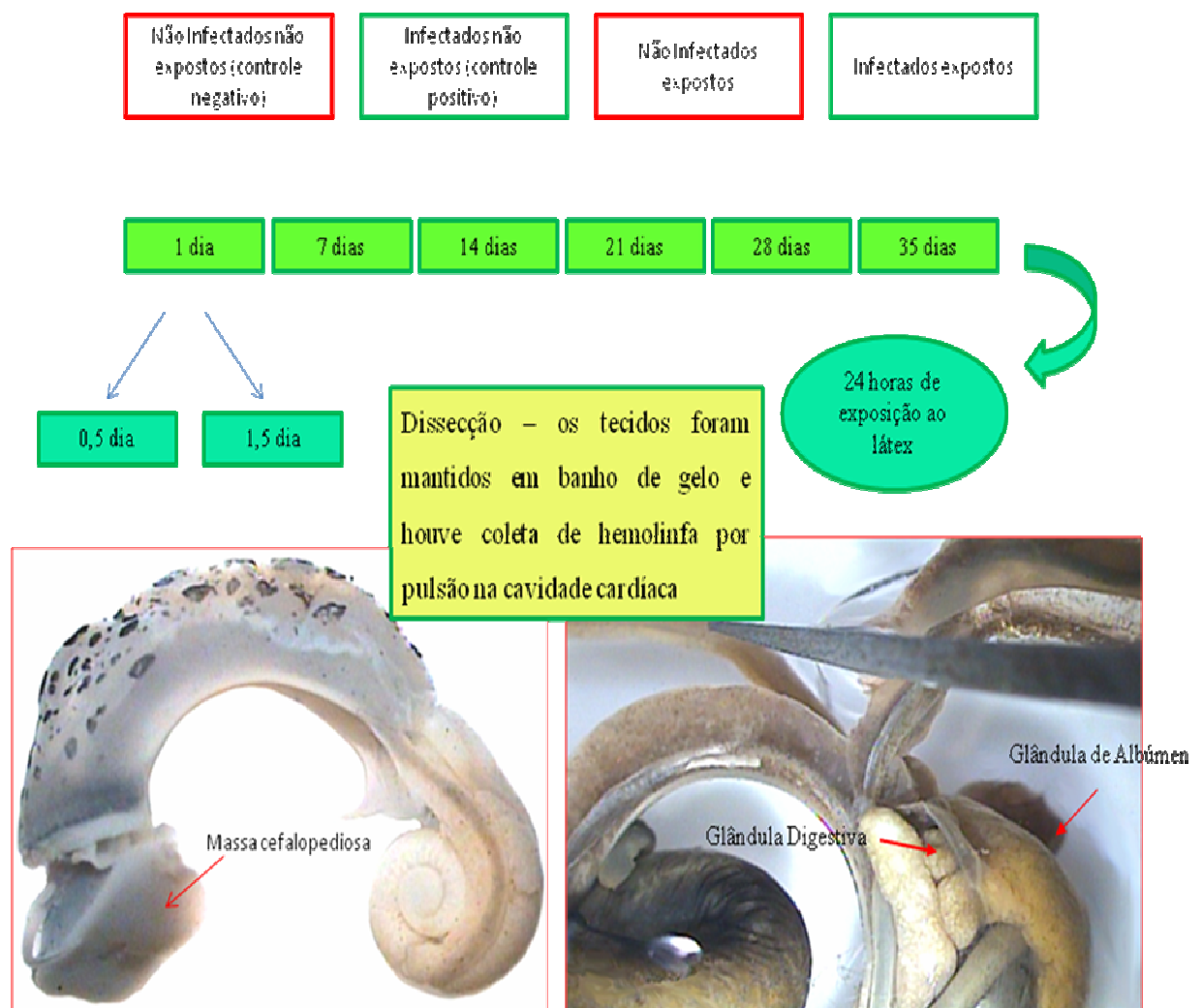
Foi determinada a concentração de glicose, ácido úrico, uréia e proteínas totais na hemolinfa de *B. glabrata*, infectada e não infectada, expostas às diferentes concentrações de látex de *E. splendens* var. *hislopii* e expressas em mg/dl. Para as determinações foram utilizados kits de diagnóstico laboratorial Katal Reagentes[®].

A extração de glicogênio da glândula digestiva e massa cefalopodal seguiram a técnica descrita por PINHEIRO & GOMES (1994). As concentrações de glicogênio foram determinadas através da reação do 3,5 dinitro

salicilato (DNS) (SUMNER, 1924) e expressas em mg de glicose/g de tecido, peso fresco.

3.11 – Análises Estatísticas

Os resultados obtidos nas determinações bioquímicas foram expressos através de média \pm desvio-padrão e submetidos ao teste de análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey-Kramer e ao teste t de Student para dados não pareados para comparação das médias ($\alpha=5\%$).



Fotos cedidas pela prof.ª Dra Solange L.P Brandolini

Figura 11 – Esquema geral do experimento de metabolismo energético nos intervalos de 0,5 a 35 dias.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Análise Físico-Química da Solução Aquosa do Látex

Os parâmetros físico-químicos analisados estão apresentados na Tabela 1, onde foi observado que não houve qualquer alteração na composição da solução que pudesse influenciar na atividade da solução aquosa do látex de *E. splendens* var. *hislopii*. Nenhum item apresentou valor fora da normalidade avaliada pela análise.

Tabela 1- Características físico-químicas da solução aquosa do látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopii*.

	Solução Aquosa do látex de <i>E. splendens</i> var. <i>hislopii</i>	Valores Máximos da Água em Habitat Natural de <i>Biomphalaria glabrata</i> (PIERI, 1995)
Condutividade ($\mu\text{S/cm}$)	030.04	2.000,0
Alcalinidade (mg/l CaCO_3)	000.00	415,0
Cloro (mg/l Cl^-)	012.00	18,1
Cálcio (mg/l)	001.60	129,0
pH	006.69	9,1

4.2- Experimento de Concentração-Letal

Para a determinação da Cl_{50} o grupo de moluscos expostos a solução com concentração de 0.7 μl apresentou 50% de mortalidade nas primeiras 24 horas do experimento. Os demais grupos apresentaram valores superiores no mesmo período observado, como representado na Tabela 2 abaixo.

Tabela 2- Número de moluscos da espécie *Biomphalaria glabrata* expostos ao látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopii* para determinação de CI_{50} .

Concentrações (μ l)	Exposição 24 horas			Recuperação 48 horas				Total de sobreviventes
	sairam	Não saíram		sairam		Não saíram		
		vivos	mortos	Vivos	mortos	vivos	Mortos	
Controle	03	17	-	01	-	19	-	20
0,7	-	11	09	-	-	05	06	05
0,8	-	08	12	-	-	06	14	06
1,0	-	06	14	-	-	02	18	02
1,2	-	11	09	-	-	01	19	01

4.3- Aspectos da Biologia Reprodutiva de *Biomphalaria glabrata*

Durante os 30 dias de experimento a sobrevivência dos moluscos, *B. glabrata*, não infectados e infectados, por *S. mansoni*, não expostos ao látex de *E. splendens* var. *hislopii* foi maior do que aquela observada para os exemplares não infectados e os infectados expostos ao látex. De acordo com as tabelas 3 e 4 a taxa de mortalidade atingiu valores acima de 90% nos 3 primeiros dias para os moluscos infectados e não infectados, expostos ao látex, enquanto os demais grupos mantiveram valores abaixo de 10% (Gráfico I). A relação entre a mortalidade e o tempo de exposição foi proporcionalmente positiva, de forma que quanto maior o número de dias que os moluscos, infectados e não infectados, eram mantidos em contato com a solução aquosa do látex, maior o número de indivíduos mortos. Segundo Schall *et al.* (1992) estudos sobre o tempo de duração do efeito de moluscicida de uma solução aquosa do látex de *E. splendens* var. *hislopii* na concentração de 5 mg de látex/L, a solução se manteve ativa por 13 dias, perdendo totalmente sua ação após 30 dias, por sua característica fotossensível. Schall *et al.* (1998) e Mello-Silva *et al.* (2006) observaram que a taxa de mortalidade de *B. glabrata* é diretamente proporcional ao aumento da concentração do látex de *E. splendens* var. *hislopii*, quando testada a CI_{50} e CL_{90} num período de 24 horas de exposição. No estudo em questão não houve aumento da concentração do látex, mas o mesmo comportamento foi observado conforme a permanência dos moluscos em solução.

Além da sobrevivência dos indivíduos, a exposição prolongada ao látex alterou o comportamento reprodutivo dos moluscos. Foi observado que os expostos ao látex iniciaram as posturas apenas 4 dias após a exposição e o grupo dos infectados apresentou uma redução de 80% no número de ovos em relação ao grupo não infectado com látex no mesmo período (Gráficos II e III). Os animais em solução apresentaram um comportamento reprodutivo diferente em relação aos grupos não expostos ao látex (Gráficos IV e V). Nos grupos expostos ao látex, os infectados apresentaram um número total de ovos férteis três vezes menor que os não infectados (Tabela 3 e 4).

A exposição ao látex provocou uma redução significativa no número total de massas ovígeras produzidas, com uma redução de 98,4% para *B. glabrata* infectada e exposta ao látex, e de 97,8% para os moluscos não infectados, porém também expostos. Em ambos os grupos expostos, a postura foi cessada no mesmo intervalo de tempo, 7 dias após o início do experimento. A atividade reprodutiva analisada através do número de massas ovígeras/molusco também apresentou uma redução de 69% para os indivíduos em solução. Bem como o número de ovos/molusco que sofreu uma redução significativa nos grupos expostos, com cerca de 65% e 62%, para moluscos infectados e não infectados, respectivamente. Sendo, esta redução, confirmada pela relação de número de ovos/massa ovígera que reduz em 67% para os moluscos infectados e 95% para os não infectados (Tabela 3 e 4).

Tabela 3- Aspectos da biologia reprodutiva de *Biomphalaria glabrata* infectado por *Schistosoma mansoni* exposto ao látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopii* observados por 30 dias. N=230 caramujos. C = Infectado exposto ao látex (115 caramujos) e S= infectado sem exposição ao látex (115 caramujos).

Tempo (dias)	Mortalidade (%)		N° de massas ovíferas		N° de massas ovíferas/ molusco		N° total de ovos férteis		N° de ovos/ caramujo		N° de ovos/ massa ovígera	
	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	94,8	5,2	0	67	0	0,6	0	613	0	5,6	0	9,1
4	0	0	01	41	0,16	0,37	10	311	1,6	2,8	10,0	7,6
5	0	0	0	18	0	0,16	0	162	0	1,5	0	9,0
6	16,7	0	02	14	0,4	0,12	14	107	2,8	1,0	7,0	7,6
7	0	0	0	10	0	0,09	0	95	0	0,9	0	9,5
8	0	0	0	08	0	0,07	0	43	0	0,4	0	5,3
11	0	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	20	6,2	0	17	0	0,18	0	17	0	0,2	0	1,0
15	25	0	0	05	0	0,05	0	04	0	0,04	0	0,8
17	33,4	0	0	05	0	0,05	0	03	0	0,03	0	0,6
29	50	0	0	07	0	0,07	0	03	0	0,03	0	0,4
30	100	32	0	05	0	0,08	0	03	0	0,04	0	0,6
Total	100	32	03	197	0,56	1,77	24	1.361	4,4	12,54	17	51,5

Tabela 4- Aspectos da biologia reprodutiva de *Biomphalaria glabrata* exposto ao látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopii* observados por 30 dias. N=230 caramujos. C = não-Infectado com exposição ao látex (115 caramujos) e S= não-infectado sem exposição ao látex (115 caramujos)

Tempo (dias)	Mortalidade (%)		N° de massas ovíferas		N° de massas ovíferas/ molusco		N° total de ovos férteis		N° de ovos/ caramujo		N° de ovos/ massa ovígera	
	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	93,04	6,08	0	79	0	0,7	0	797	0	7,3	0	10,0
4	0	0	02	55	0,25	0,5	49	479	6,1	4,4	0,9	8,7
5	0	0	01	14	0,12	0,12	09	89	1,1	0,8	0,6	6,0
6	0	0	03	23	0,4	0,2	24	195	3,0	1,8	1,0	8,5
7	0	0	0	15	0	0,13	0	104	0	0,9	0	6,9
8	0	0	0	06	0	0,05	0	51	0	0,5	0	8,5
11	25	4,62	0	12	0	0,11	0	25	0	0,2	0	2,1
13	0	0	0	27	0	0,26	0	24	0	0,2	0	0,9
15	0	15,53	0	05	0	0,05	0	03	0	0,03	0	0,6
17	0	0	0	17	0	0,2	0	17	0	0,2	0	1,0
29	66,6	0	0	18	0	0,2	0	12	0	0,13	0	0,6
30	0	3,44	0	04	0	0,04	0	0	0	0,04	0	0
Total	66,6	3,44	06	275	0,77	2,56	84	1.796	10,2	26,7	2,5	56,3

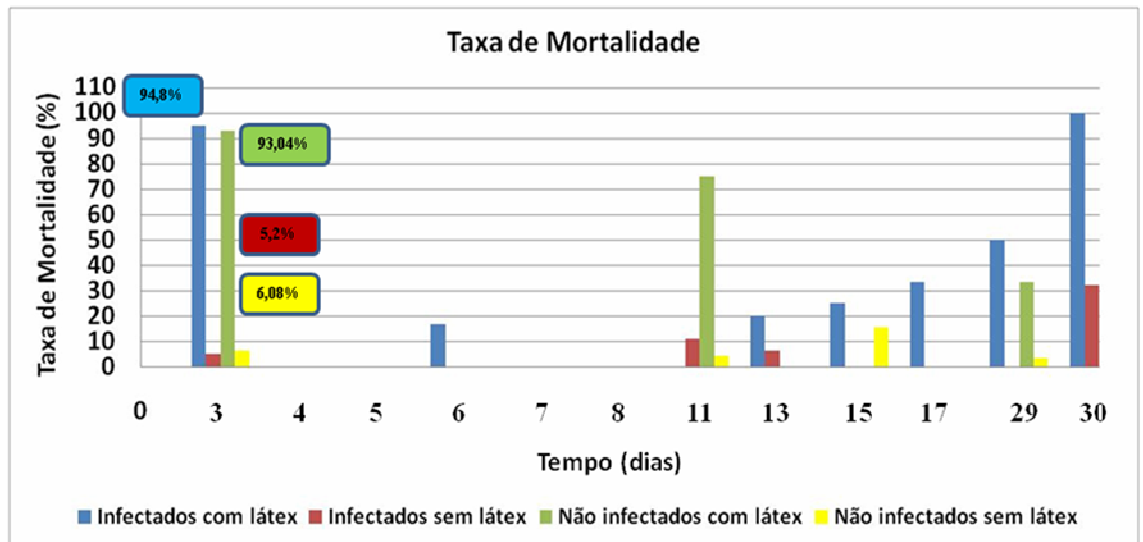


Gráfico I – Taxa de mortalidade de *Biomphalaria glabrata* infectada e não infectada por *Schistosoma mansoni* expostas ao látex de *Euphorbia splendens* var *hispida* durante 30 dias

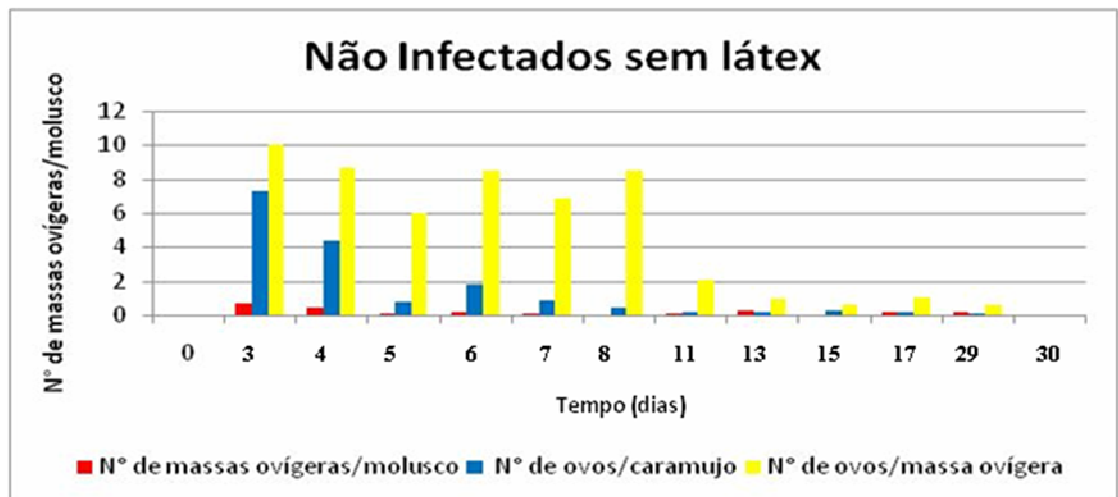


Gráfico II- Número de ovos e massas ovíferas/molusco de *Biomphalaria glabrata* durante 30 dias.

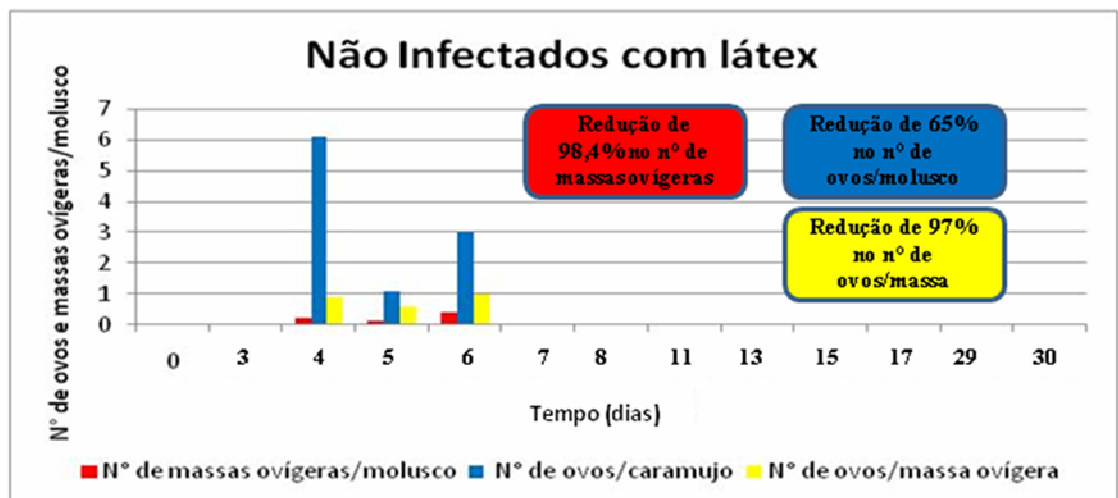


Gráfico III- Número de ovos e massas ovíferas/molusco de *Biomphalaria glabrata* expostos ao látex de *Euphorbia splendens* var. *hispida* durante 30 dias.

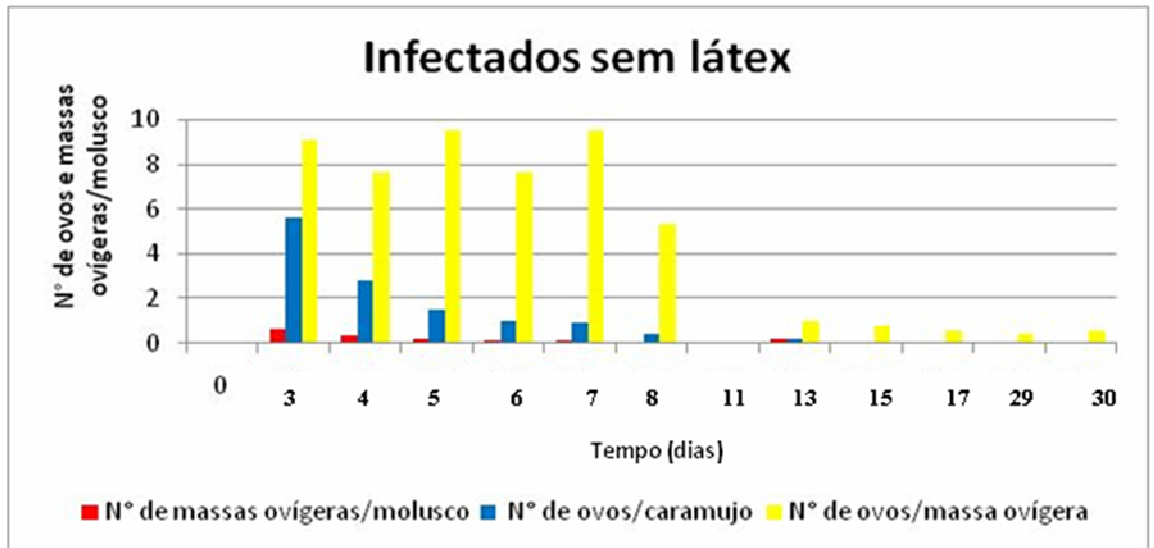


Gráfico IV - Número de ovos e massas ovíferas/molusco de *Bionophalaria glabrata* infectada por *Schistosoma mansoni* durante 30 dias.

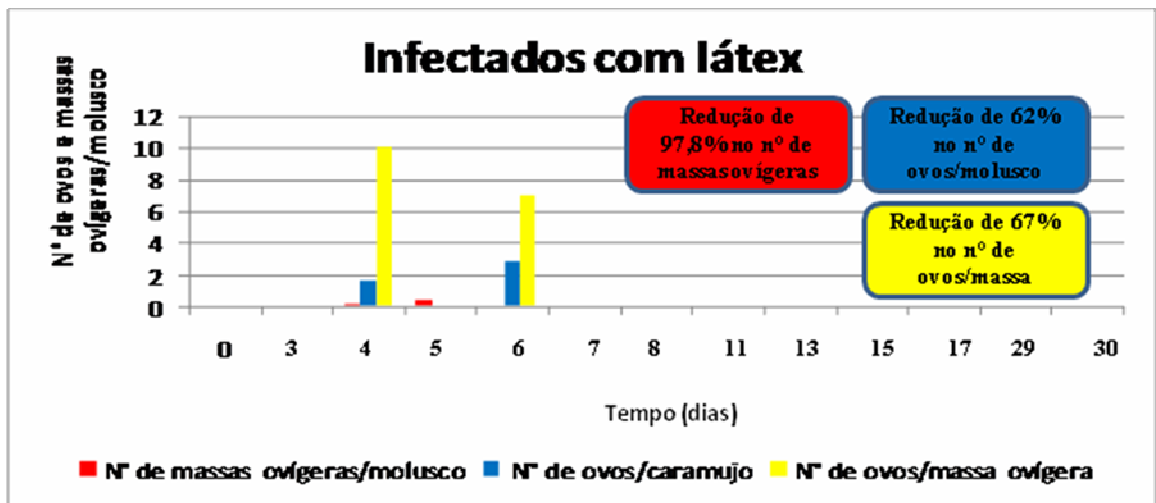


Gráfico V - Número de ovos e massas ovíferas/molusco de *Bionophalaria glabrata* infectada por *Schistosoma mansoni* expostos ao látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopii* durante 30 dias.

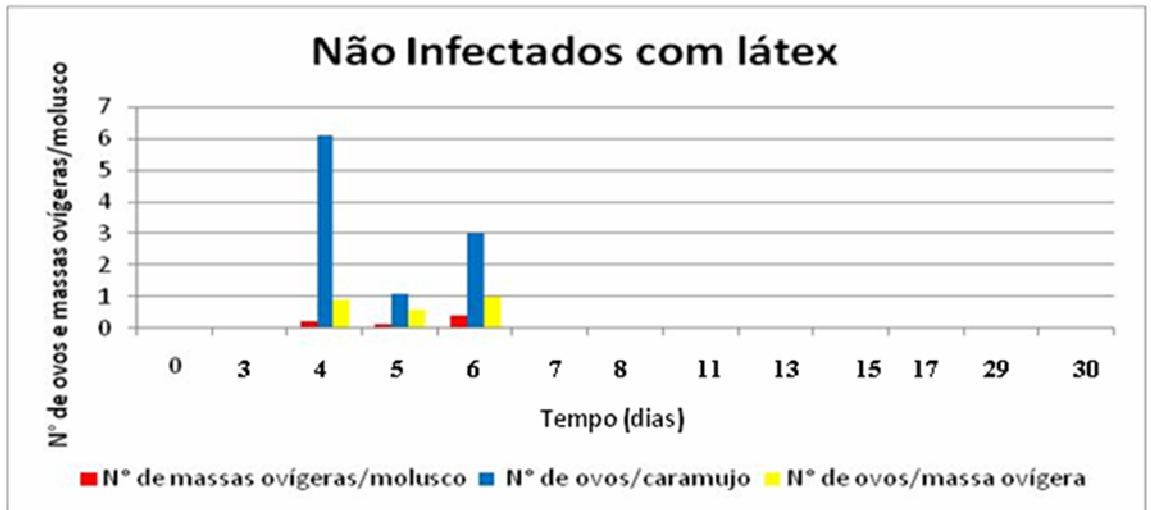


Gráfico III- Número de ovos e massas ovíferas/molusco de *Biomphalaria glabrata* expostos ao látex de *Euphorbia splendens* var. *histoyi* durante 30 dias.

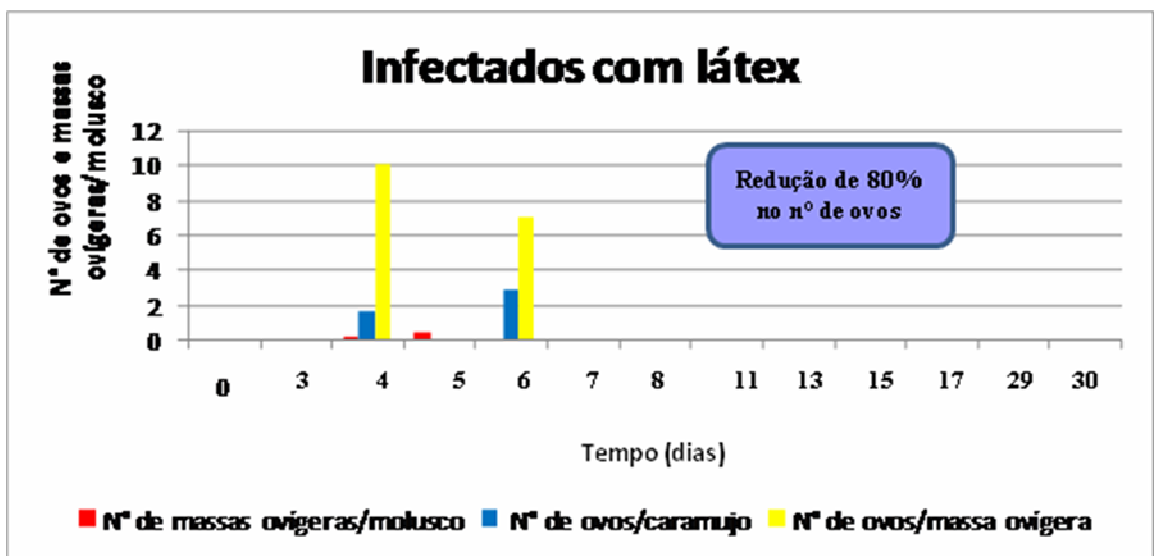


Gráfico V - Número de ovos e massas ovíferas/molusco de *Biomphalaria glabrata* infectada por *Schistosoma mansoni* expostos ao látex de *Euphorbia splendens* var. *histoyi* durante 30 dias.

Os moluscos, infectados e não infectados, expostos ao látex, apresentaram claramente um menor gasto energético no seu processo reprodutivo. O que pode ser constatado pelo menor número de massas ovíferas e maior número de ovos/massa. Apesar de não apresentar um valor expressivo, esse fato demonstra o esforço do animal em compensar a alteração na fecundidade em função do estresse sofrido, dando margem para o fenômeno de castração. Segundo Sullivan *et al.* (1985), a castração pode ser, também, um efeito secundário, decorrente de alterações que sejam causadas no organismo do hospedeiro em decorrência da presença dos estágios larvares, tais como: alterações no seu metabolismo, a drenagem de nutrientes, a obstrução dos seios hemolinfáticos que nutrem as

gônadas, ou a interferência com o sistema neuroendócrino do molusco. No entanto, Mello-Silva *et al.* (2007) observaram que ao submeter *B. glabrata* ao extrato aquoso do látex de *E. splendens* var. *hislopii* houve alterações na biologia reprodutiva do molusco, com características semelhantes às aquelas demonstradas por Minchella (1985), quando submeteu moluscos a infecção por *S. mansoni*; e estes apresentaram claramente um processo de compensação de fecundidade em função do estresse fisiológico. Fatos como a redução no número de massas ovíferas e maior número de ovos/massa também foram observados por Mello-Silva *et al.* (2007).

Muitos autores verificaram os efeitos das larvas de trematódeos sobre a reprodução de moluscos. Em 1972, Hodasi utilizou o modelo *F. hepatica/L.truncatula* e observou a completa interrupção da oviposição do molusco após cinco semanas de infecção. Outros autores observaram que há uma redução na fecundidade de *B. glabrata* nas fases intermediárias e finais do ciclo biológico de *S. mansoni*, com queda na produção de ovos e redução do gasto energético (LOKER & ETGES, 1979; CREWS & YOSHINO, 1989; 1991). Em 2001, Hurd utilizou exemplos de moluscos infectados com estágios larvais de trematódeos, para abordar a redução na produção de ovos e os mecanismos fisiológicos envolvidos na redução do processo reprodutivo do hospedeiro e avaliar a hipótese de que a castração pode ser um resultado da infecção ou uma estratégia adaptativa por parte do parasito ou do hospedeiro.

Sendo assim, o presente estudo vem ressaltar, junto com Schall *et al.* (1998) e Mello-Silva *et al.* (2007) que a ação da solução aquosa do látex de *E. splendens* var. *hislopii* sobre a reprodução de *B. glabrata* se assemelha aos observados nos indivíduos parasitados por diferentes estágios larvais de trematódeos. Somado a isso, Mantawy (2001) e Tantawy (2002) que trabalharam com plantas de ação moluscicida, demonstraram que quanto maior a concentração dos extratos, menor o potencial reprodutivo dos moluscos. Logo, o estresse desencadeado pela ação do látex resultou em mecanismos compensatórios e reguladores da atividade reprodutiva dos moluscos utilizados neste estudo.

4.4- Alterações nas reservas energéticas de *Biomphalaria glabrata* infectada por *Schistosoma mansoni* associada ao tempo de degradação do látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopii*.

4.4.1- Concentração de glicogênio nos tecidos de massa cefalopediosa e glândula digestiva.

Os valores para os níveis de glicogênio nos tecidos de reserva, massa cefalopediosa e glândula digestiva, de *B. glabrata* infectada por *S. mansoni*, associada ao tempo de degradação do látex estão apresentados na tabela 5 e 6, respectivamente.

Foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos, no período de exposição ao látex. Todos os grupos foram expostos à concentração de 0,7 mg/l do látex.

De acordo com a tabela 5, nos períodos de 0,5 e 1,0 dias de exposição ao látex, os exemplares de *B. glabrata* apresentaram diferença significativa nos conteúdos de glicogênio da massa cefalopediosa. Sendo que no primeiro período citado o grupo de moluscos infectados expostos, a concentração de glicogênio na massa cefalopediosa, foi 68% maior do que a do grupo de infectados não expostos. No período de 1,0 dia, a concentração de glicogênio nos moluscos não infectados expostos foi 19% menor do que os moluscos não infectados não expostos. Os moluscos infectados expostos reduziram a concentração de glicogênio em 9% quando comparados aos moluscos infectados não expostos. No entanto no intervalo de 1,5 dias essas diferenças não foram observadas.

Na mesma tabela, quando observamos os moluscos expostos ao látex com um intervalo de 7 dias, entre uma aplicação e outra, os depósitos da massa cefalopediosa apresentaram alterações em todos os períodos de dias. As diferenças foram vistas tanto entre os tratamentos e os controles, negativo e positivo, quanto entre os próprios controles. Com 7 dias a concentração de glicogênio dos moluscos não infectados expostos foi 17% da concentração dos moluscos do grupo controle negativo. O grupo dos moluscos infectados expostos também apresentou comportamento similar, com 16% da concentração de glicogênio do grupo controle positivo. Aos 14 dias o comportamento entre os grupos seguiu semelhante; os moluscos não infectados expostos apresentaram 14% da concentração de glicogênio do grupo controle negativo e os moluscos

infectados apresentaram 20%, da mesma concentração, quando comparados com o grupo controle positivo.

A partir dos 21 dias as diferenças percentuais das concentrações de glicogênio entre os grupos começam a diminuir e tendem a igualar. Neste período os moluscos não infectados apresentam 82% da concentração de glicogênio do grupo controle negativo e os moluscos infectados apresentaram 52% da concentração de glicogênio comparados aos moluscos infectados não expostos. Com 28 dias os moluscos não infectados expostos apresentaram um valor de 89% da concentração de glicogênio dos moluscos não exposto e não infectados; já nos moluscos infectados expostos foi observado o valor de 81% desta mesma concentração. Por fim, aos 35 dias os moluscos do grupo controle negativo e os moluscos não infectados expostos apresentaram o mesmo valor da concentração de glicogênio. Enquanto o grupo de moluscos infectados apresentou um valor de 17% a mais da concentração quando comparados aos moluscos do controle positivo.

Quando se observa a tabela 5 pode-se perceber que nos períodos de 7 e 14 dias as diferenças das concentrações entre os tratamentos e os grupos controles permanecem grande. No entanto, esses valores tendem a estabilizar a partir dos 21 dias, as concentrações entre os grupos comparados ficam maior ou igual aos 35 dias de exposição ao látex.

Tabela 5- Concentração de glicogênio (mg de glicose/g de tecido peso fresco) na massa cefalopediosa de *Biomphalaria glabrata*, infectada e não infectada, por *Schistosoma mansoni* exposta ao látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopii*, na concentração de 0,7 mg/l, no período de 0.5 a 35 dias.

Grupos	0.5 dias	1.0 dias	1.5 dias	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias	35 dias
	X ± DP	X ± DP	X ± DP	X ± DP	X ± DP	X ± DP	X ± DP	X ± DP
Não infectados não expostos ao látex	2,5 ± 0,2a	3,7 ± 0,2a	3,5 ± 0,2a	2,9 ± 0,05a	2,8 ± 0,06a	2,9 ± 0,06a	2,7 ± 0,05a	2,8 ± 0,06a
(controle negativo)								
Infectados não expostos ao látex	2,9 ± 0,5a	5,5 ± 0,2b	5,3 ± 0,5a	1,9 ± 0,04b	2,0 ± 0,07b	2,7 ± 0,04a	2,7 ± 0,1a	2,3 ± 0,03b
(controle positivo)								
Não infectados expostos ao látex	2,5 ± 0,4a	3,0 ± 1,0ac	4,2 ± 1,8a	0,5 ± 0,04c	0,4 ± 0,1bc	2,4 ± 0,05b	2,4 ± 0,05a	2,8 ± 0,04a
Infectados expostos ao látex	4,2 ± 0,1b	5,0 ± 0,3b	4,7 ± 1,3a	0,3 ± 0,06d	0,4 ± 0,06bc	1,4 ± 0,04c	2,2 ± 0,2b	2,7 ± 0,07a

Sendo X a média, DP o desvio padrão. Letras distintas indicam médias diferentes entre si, quando comparadas ao grupo controle, $p < 0,05$.

Quanto às reservas energéticas da glândula digestiva, os resultados estão presentes na tabela 6. O conteúdo de glicogênio na glândula digestiva de *B. glabrata* não infectada exposta no período de 0,5 dias foi de 97% do conteúdo observado no grupo controle negativo. Os moluscos infectados expostos apresentaram uma concentração 46% maior quando comparados ao grupo de moluscos infectados não expostos. Esse perfil inverte no período de 1,0 dia, quando os moluscos não infectados expostos apresentam um aumento de 150% na concentração de glicogênio quando comparados aos moluscos do grupo controle negativo. Por sua vez, os moluscos infectados apresentam 75% do valor desta concentração quando comparados aos moluscos do grupo controle negativo. Aos 1,5 dias ambos os grupos comparados apresentaram valores elevados nas concentrações; os moluscos não infectados expostos apresentaram um valor de 116% quando comparados ao controle negativo e os moluscos infectados expostos apresentaram um valor de 114% quando comparados ao controle positivo.

Quando os períodos atingem intervalos de 7 dias entre uma aplicação e outra do látex, o comportamento das concentrações de glicogênio na glândula digestiva se assemelha ao visto no tecido de massa cefalopediosa. Entre os períodos de 7 a 14 dias os valores destas concentrações apresentam-se com diferenças altas, mas a partir dos 21 dias os valores tendem a estabilizar e quando chegam aos 35 dias ficam igual ou maior entre os grupos comparados, indicando uma tendência à recuperação.

Com 7 dias os moluscos não infectados expostos apresentam 25% da concentração de glicogênio do grupo controle negativo e os moluscos infectados apresentaram 17% do controle positivo. Aos 14 dias os valores apresentados pelos mesmos grupos comparados foram respectivamente, 12% e 22%.

A partir dos 21 dias esses valores aumentaram e a concentração de glicogênio nos moluscos não infectados expostos foi de 86% dos moluscos do grupo controle negativo e os moluscos infectados foi de 56% dos moluscos do grupo controle positivo. Aos 28 dias há um aumento em ambos os grupos comparados, nos primeiros a concentração foi de 88% e no segundo foi de 91%. Ao fim da exposição, aos 35 dias, os moluscos não infectados apresentaram a mesma concentração de glicogênio na glândula digestiva quando comparados aos moluscos do grupo controle negativo e os moluscos infectados expostos

apresentaram 123% da concentração de glicogênio dos moluscos do controle positivo.

Tabela 6- Concentração de glicogênio (mg de glicose/g de tecido peso fresco) na glândula digestiva de *Biomphalaria glabrata*, infectada e não infectada, por *Schistosoma mansoni* exposta ao látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopii*, na concentração de 0,7mg/l, no período de 0.5 a 35 dias.

Grupos	0.5 dias	1.0 dias	1.5 dias	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias	35 dias
	X ± DP	X ± DP	X ± DP	X ± DP	X ± DP	X ± DP	X ± DP	X ± DP
Não infectados não expostos ao látex	3,2 ± 0a	2,6 ± 0,3a	3,1 ± 0,2a	2,8 ± 0,06a	2,5 ± 0,02a	2,6 ± 0,02a	2,6 ± 0,05a	2,6 ± 0,05a
(controle negativo)								
Infectados não expostos ao látex	2,8 ± 0a	5,5 ± 0,3b	5,6 ± 0,4b	1,8 ± 0,04b	2,3 ± 0,04b	2,4 ± 0,1a	2,3 ± 0,1b	2,1 ± 0b
(controle positivo)								
Não infectados expostos ao látex	3,1 ± 0,2a	3,9 ± 0a	3,6 ± 0,5a	0,7 ± 0,04c	0,3 ± 0,01c	2,3 ± 0,5a	2,3 ± 0,06b	2,6 ± 0,07a
Infectados expostos ao látex	4,1 ± 0,6b	4,1 ± 1,4b	6,4 ± 0,2b	0,3 ± 0,03d	0,5 ± 0,1c	1,4 ± 0,1b	2,1 ± 0,09b	2,6 ± 0,09a

Sendo X a média, DP o desvio padrão. Letras distintas indicam médias diferentes entre si, quando comparadas ao grupo controle, $p < 0,05$.

Em 1980, Becker afirmou que ao invadir o molusco hospedeiro as larvas de trematódeos desencadeiam danos nas vias metabólicas em função da drenagem de nutrientes. Em resposta ao estresse causado pela infecção observa-se a aceleração da via da glicogenólise, como consequência do aumento do consumo de glicose da hemolinfa pelas formas larvais. Os danos causados pelas larvas foram comparados, pelo autor, com aqueles causados por um estado de jejum severo. A degradação dos estoques de glicogênio nos tecidos foi verificada em *B. glabrata* sob situações adversas no meio ambiente, como a anaerobiose, processos de estivação e jejum (BRUCE *et al.* 1969; CHIANG *et al.*, 1977; STANISLAWSKY & BECKER, 1979; SCWARTZ & CARTER, 1982; LIVINGSTONE & ZWAAN, 1983).

Assim como as situações citadas acima, a exposição a soluções aquosas de origem vegetal também causam alterações na fisiologia destes moluscos; de acordo com Mello-Silva *et al.* (2006a), ao expor *B. glabrata* à solução aquosa do extrato de *S. malacoxylon* em diferentes intervalos de tempo os moluscos apresentaram uma variação significativa nas reservas energéticas dos tecidos de massa cefalopédica e glândula digestiva. Os autores sugerem que a variação no conteúdo de glicogênio, principalmente entre 24 e 72 horas, está relacionada à aceleração do processo de glicogenólise nas primeiras 24 horas do tratamento.

Em outro trabalho Mello-Silva *et al.* (2006b) expõem exemplares de *B. glabrata* a diferentes concentrações aquosas do látex de *E. splendens* var. *hislopii* e verificam que a relação entre os níveis de glicogênio na massa cefalopédica e o aumento da concentração da solução foi negativa, e que os grupos não foram significativamente diferentes. Contudo, a relação entre o conteúdo de glicogênio presente na glândula digestiva foi positiva em função do aumento da concentração do látex na solução, e também sem diferença estatística entre os grupos.

No presente estudo, os resultados obtidos indicam que os gastos de energia provocados pela infecção e exposição ao látex induziram ao aumento do consumo de glicogênio nos tecidos de reserva, massa cefalopédica e glândula digestiva. A diminuição dos conteúdos de glicogênio em ambos os tecidos ficam claros a partir do 7º dia de exposição ao látex que coincide com a primeira semana de infecção, no momento em que os miracídios passam a esporocistos

primários. E em seguida quando estes se transformam em esporocistos secundários e localizam-se próximos à glândula digestiva.

Assim como os moluscos infectados e expostos à solução aquosa do látex, os moluscos não infectados e expostos apresentaram uma diminuição dos conteúdos de glicogênio nos tecidos analisados, tão drástica quanto os primeiros nos 14 primeiros dias de exposição ao produto. Em ambos os casos, somente a partir do 21º dia os valores das concentrações das moléculas de glicogênio foram aproximando-se aos valores dos controles, mas, ainda apresentando diferenças estatísticas significantes.

Os resultados encontrados neste estudo corroboram os dados encontrados por Mello-Silva (2005) quando foi estudada a influência da exposição ao látex de *E. splendens* sobre os depósitos de carboidratos e glicose na hemolinfa de *B. glabrata* infectada com *S. mansoni*. Neste estudo, a autora verificou que os conteúdos de glicogênio, nos mesmos tecidos, dos moluscos infectados também sofreram uma redução em relação ao grupo controle. E que a associação da infecção com ação do látex provocaram a redução do conteúdo das reservas energéticas nos tecidos de massa cefalopediosa e glândula digestiva.

Os dados apresentados, no presente trabalho, sugerem que as alterações causadas pelo látex afetaram tanto os moluscos infectados como os não infectados, a partir da aplicação da CL₅₀ da solução aquosa do látex de *E. splendens*. No entanto, os exemplares infectados apresentam um período maior de baixas concentrações de glicogênio nos tecidos analisados, quando comparados aos demais.

Todas as alterações bioquímicas observadas no presente estudo indicam que as ações desencadeadas pelo organismo do molusco hospedeiro são respostas para manutenção da homeostase, tanto em função da infecção como da ação da solução aquosa de látex de *E. splendens* var. *hislopii*.

4.4.2- Concentração de glicose e proteínas totais na hemolinfa

Na análise da variação da concentração de glicose na hemolinfa de *B. glabrata*, os valores obtidos para os diferentes grupos de moluscos infectados e expostos, não infectados e expostos e os controles, negativo e positivo, foram comparados entre si, havendo diferença significativa entre eles (Tabela 7).

A concentração de glicose livre circulante na hemolinfa dos moluscos analisados apresentou perfis diferentes das concentrações de glicogênio nos tecidos de reserva estudados anteriormente. Com 0,5 dia de exposição ao látex o grupo de moluscos não infectados expostos apresentou 42% da concentração de glicose quando comparados ao grupo de moluscos do grupo controle negativo. Por outro lado, os moluscos infectados apresentaram 144% dessa concentração quando comparados aos moluscos do grupo controle positivo. Com 1,0 dia de exposição ao látex os grupos comparados apresentaram os respectivos valores de concentração de glicose, 61% e 105%. Com 1,5 dias de exposição ao látex foi observado um aumento na concentração de glicose nos moluscos não infectados expostos de 117% quando comparados ao grupo controle negativo. Os animais infectados expostos apresentaram 130% do valor da concentração de glicose do grupo controle positivo.

Nos períodos com intervalos de 7 dias entre uma aplicação e outra, com 7 dias os moluscos não infectados expostos apresentaram uma concentração de glicose de 30% do grupo controle negativo, redução que não foi vista nos moluscos infectados, que apresentaram um valor de 433% da concentração do grupo controle positivo. A partir do 21º até o 28º dias os valores das concentrações de glicose dos moluscos não infectados e infectados expostos ao látex mantiveram-se maiores do que seus respectivos grupos controle. Com valores de 103% e 119% entre os grupos comparados respectivamente aos 21 dias e com 109% e 125% aos 28 dias. No 35º dia foi observada queda destas concentrações, os moluscos não infectados expostos apresentaram 98% da concentração de glicose do grupo controle negativo e os moluscos infectados expostos apresentaram 39% da mesma concentração em relação ao controle positivo.

Além das diferenças vistas pelo teste de Tukey entre os grupos expostos e os grupos controle, também houve diferença entre os grupos expostos. Com 0,5 dia de exposição a diferença percentual entre os grupos de moluscos expostos foi de 137% para os moluscos infectados em relação aos não infectados para concentração de glicose livre na hemolinfa. Com 1,0 dia de exposição houve um pico de 252% para esse valor, que quando alcançou 1,5 dias de exposição reduziu para 111%. Quando as observações foram feitas nos intervalos de 7 dias de aplicação, esse percentual atingiu um novo pico de 403% aos 7 dias. A partir

do 14° dia esse valor entrou em queda novamente, não ultrapassando mais o valor atingido anteriormente.

No 7° dia de exposição ao látex o grupo de *B. glabrata* infectadas por *S. mansoni* expostas ao látex, apresentaram valores elevados na concentração de glicose livre na hemolinfa, o que condiz com a redução vista na tabela anterior dos depósitos de glicogênio nos tecidos de reserva.

Já o grupo de moluscos não infectados, mas expostos ao látex de *E. splendens var. hislopii* apresentaram no 14° dia de exposição ao látex uma elevada concentração de glicose livre na hemolinfa, também condizente com a queda nos estoques de glicogênio nos tecidos de massa cefalopediosa e glândula digestiva.

Tabela 7- Concentração de glicose (mg /dl) na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata*, infectada e não infectada, por *Schistosoma mansoni* exposta ao látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopii*, na concentração de 0,7 mg/l, no período de 0.5 a 35 dias.

Grupos	0.5 dias	1.0 dias	1.5 dias	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias	35 dias
	X ± DP	X ± DP	X ± DP	X ± DP	X ± DP	X ± DP	X ± DP	X ± DP
Não infectados não expostos ao látex	21,3 ± 0,4a	7,6 ± 1,5a	5,6 ± 2,3a	28,9 ± 2,1a	29,0 ± 2,1a	29,0 ± 2,1a	28,0 ± 0,8a	33,0 ± 0,6a
(controle negativo)								
Infectados não expostos ao látex	8,5 ± 1,2b	11,0 ± 0,2b	5,6 ± 2,3a	8,2 ± 0,6b	8,6 ± 0,3b	15,4 ± 0,8b	28,0 ± 0,6a	22,0 ± 0,2b
(controle positivo)								
Não infectados expostos ao látex	8,9 ± 0,4bc	4,6 ± 0,9c	6,6 ± 1,1a	8,8 ± 0,9b	34,3 ± 0,8c	30,0 ± 2,0a	30,5 ± 1,5a	32,2 ± 3,1a
Infectados expostos ao látex	12,2 ± 2,3c	11,6 ± 0,9b	7,3 ± 2,0a	35,5 ± 0,6c	11,6 ± 1,0b	18,4 ± 1,2b	35,0 ± 1,1b	8,5 ± 0,5c

Sendo X a média, DP o desvio padrão. Letras distintas indicam médias diferentes entre si, quando comparadas ao grupo controle, p<0,05.

Os valores dos níveis de proteínas totais na hemolinfa de *B. glabrata* estão apresentados na tabela 8. No período de 0,5 e 1,0 dias de exposição ao látex os grupos de moluscos em solução aquosa foram significativamente diferentes dos controles, mas iguais entre si. O grupo de moluscos não infectados expostos apresentou 37% do valor da concentração de proteínas totais na hemolinfa em relação ao grupo controle negativo no período de 0,5 dia de exposição ao látex.; com 1,0 dia de exposição esse valor teve um aumento, atingindo o valor de 207% em relação aos mesmo grupos comparados. Já os moluscos infectados expostos no primeiro período citado esse valor foi de 59% em relação ao grupo controle positivo e também apresentou aumento no período seguinte com valor de 171%. Contudo, no período de 1,5 dias, nenhum grupo diferiu estatisticamente.

Sete dias após o preparo do látex, as diferenças entre os grupos foram constantes, entre os controles, negativo e positivo, somente não houve diferença estatística nos dias 21 e 28 de degradação. Por outro lado, quando comparados os grupos de moluscos expostos com os não expostos, em todas as relações há diferenças significantes, seja para o controle negativo ou para o positivo (Tabela 8). Com 7 dias os moluscos não infectados expostos apresentaram um valor percentual de 121% da concentração de proteínas totais em relação ao grupo controle negativo. Os moluscos infectados expostos apresentaram 275% da concentração de proteínas totais do grupo controle positivo. Quando comparados entre si, os grupos de moluscos expostos, os moluscos infectados apresentaram um valor de 194% em relação aos não infectados.

Aos 14 dias de preparo do látex os moluscos não infectados expostos apresentaram 123% do valor do grupo controle negativo e os moluscos infectados expostos obtiveram 82% do valor do controle positivo. Comparados entre si, os moluscos infectados expostos apresentaram 88% da concentração das proteínas totais em relação aos não infectados expostos. Com 21 dias as relações seguem os respectivos valores, 77%, 90% e 90% da concentração de proteínas totais. A partir dos 28 até os 35 dias as relações entre os moluscos expostos e seus respectivos controles apresentaram um declínio, para os moluscos não infectados expostos o percentual foi de 58 e 57%, para os moluscos infectados expostos foi de 90 e 82%, respectivamente.

No grupo de moluscos não infectados pelo *S. mansoni*, mas expostos ao látex, durante o mesmo período de 35 dias de observação, os níveis de proteínas totais na hemolinfa apresentam uma decréscimo constante, variando de 1.7 mg/dl no 7º dia chegando a 0.8 mg/dl no último.

Tabela 8- Concentração de proteínas totais (mg/dl) na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata*, infectada e não infectada, por *Schistosoma mansoni* exposta ao látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopii*, na concentração de 0,7 mg/l, no período de 0.5 a 35 dias.

Grupos	0.5 dias	1.0 dias	1.5 dias	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias	35 dias
	X ± DP	X ± DP	X ± DP	X ± DP	X ± DP	X ± DP	X ± DP	X ± DP
Não infectados não expostos ao látex	2,7 ± 0,1a	1,4 ± 0,1a	1,7 ± 0,05a	1,4 ± 0,04a	1,3 ± 0,2a	1,3 ± 0,1a	1,2 ± 0,2a	1,4 ± 0,02a
(controle negativo)								
Infectados não expostos ao látex	1,7 ± 0,06b	1,4 ± 0,1a	1,5 ± 0,08a	1,2 ± 0,1b	1,7 ± 0,03b	1,0 ± 0,06ab	1,0 ± 0,03ab	1,1 ± 0,02b
(controle positivo)								
Não infectados expostos ao látex	1,0 ± 0,04c	2,9 ± 0,4b	1,4 ± 0,02a	1,7 ± 0,03c	1,6 ± 0,2ab	1,0 ± 0,04b	0,7 ± 0,03b	0,8 ± 0,08c
Infectados expostos ao látex	1,0 ± 0,08c	2,4 ± 0,1b	1,9 ± 0,3a	3,3 ± 0,02d	1,4 ± 0,04ab	0,9 ± 0,09b	0,9 ± 0,09b	0,9 ± 0,02d

Sendo X a média, DP o desvio padrão. Letras distintas indicam médias diferentes entre si, quando comparadas ao grupo controle, $p < 0,05$.

A alteração nas concentrações de glicose, tanto nos tecidos como na hemolinfa, de moluscos tratados com solução aquosa vegetal e com moluscicida químico foi vista por Adewunmi *et al.* (1988). Neste trabalho, os autores verificaram a ação do moluscicida Bayluscide e do extrato aquoso da planta *T. tetraptera*, sobre o metabolismo de carboidratos e proteínas de *B. glabrata*. E constataram que em ambos os casos o metabolismo do molusco sofre alterações nos seus tecidos de reservas e nos níveis de substratos energéticos disponíveis na hemolinfa.

Posteriormente, em 2001, Alcanfor observou a diminuição de glicose na hemolinfa de *B. glabrata* exposta ao tratamento com o extrato da folha e/ou da casca de *S. adstringens* e de *C. brasiliense*. Assim como, Mello-Silva *et al.* (2006a) verificaram a ação do extrato de *S. malacoxylon* nos conteúdos de glicose e proteínas livres na hemolinfa de *B. glabrata* por 72 horas de exposição. Neste estudo foi observado que o extrato reduziu os níveis de glicose na corrente hemolinfática, e que as concentrações médias de proteínas totais foram aumentando ao longo do tratamento e variando de forma significativa. Apresentando no primeiro caso, uma relação negativa, e no segundo, positiva, em função do tempo de exposição.

Quando expostas às diferentes concentrações do látex de *E. splendens* var. *hislopii* os moluscos, *B. glabrata*, também apresentaram valores reduzidos nas concentrações de glicose livre na hemolinfa em função do aumento da concentração do mesmo. E elevação dos níveis de proteínas totais na corrente hemolinfática em relação ao crescimento da concentração da solução (MELLO-SILVA *et al.* (2006b).

Quando submetidos a qualquer estresse oferecido pelo ambiente os moluscos desencadeiam mecanismo para a manutenção da homeostase de seu organismo, em função de sua sobrevivência. Ao ser infectado por larvas de trematódeos ou exposto às soluções aquosas de plantas, os moluscos apresentam variações nas concentrações de glicose e de proteínas totais circulantes na corrente hemolinfática. No primeiro caso, ao serem consumidas pelas larvas, as moléculas de glicose são mobilizadas a partir da quebra do glicogênio nos tecidos de reserva. Uma vez, consumida a glicose circulante, o molusco hospedeiro lança mão de substratos energéticos equivalentes para maior produção de ATP (Trifosfato de Adenosina) e, então, são consumidas as

proteínas totais e aminoácidos livres na hemolinfa (MICHELSON & DUBOIS, 1975; SCHMALE & BECKER, 1977).

No presente estudo, o aumento dos níveis de glicose circulante coincide com o decréscimo de estoques de glicogênio nos tecidos de massa cefalopediosa e glândula digestiva, em ambos os grupos expostos à solução aquosa do látex. O que sugere que o estresse causado pela ação do látex tenha desencadeado processos compensatórios de obtenção de energia. Contudo, os níveis de proteínas totais não se apresentam elevados, indicando que há um provável processo de ativação das vias metabólicas básicas, onde há o uso de proteínas e aminoácidos para produção de energia.

4.4.3 – Concentração de ácido úrico e uréia na hemolinfa

Os resultados das concentrações de ácido úrico na hemolinfa de *B. glabrata* estão colocados na tabela 9. Os grupos de controles, negativo e positivo, foram predominantemente diferentes segundo o teste de Tukey. Bem como, os grupos de moluscos expostos ao látex, quando comparados entre si. O grupo de moluscos infectados expostos ao látex apresentou um valor elevado nos níveis de ácido úrico circulante na hemolinfa, no período de 7 a 35 dias de preparo do látex por 24 horas de exposição. Ao contrário dos resultados vistos durante o período de 0,5 a 1,5 dias de exposição, que se aproximaram de zero (0) durante a exposição dos moluscos à solução aquosa do látex. Já o grupo dos moluscos expostos, porém não infectados por *S. mansoni* apresentaram valores significativamente diferentes do grupo controle negativo, mas sem valores elevados dos níveis do produto nitrogenado.

Com 0,5 dias de exposição à solução quando comparamos a concentração de ácido úrico dos moluscos não infectados expostos com os moluscos do grupo controle negativo o valor é de 30% do grupo controle. Os moluscos infectados expostos não apresentaram diferença ao grupo controle positivo. O que não ocorre no período de 1,0 dia quando os valores são de 38% e 24%, respectivamente para os grupos comparados acima. Com 1,5 dias esses valores percentuais mostram-se elevados, com 214% e 75% para os respectivos grupos.

No decorrer dos dias subsequentes ao preparo da solução aquosa do látex foram observadas diferenças entre os grupos de moluscos expostos e seus

respectivos controles e entre os próprios grupos de animais expostos ao látex entre si. Com 7 dias a diferença percentual entre os moluscos não infectados expostos e o controle negativo foi 37% menor. Para os moluscos infectados expostos e o controle positivo, a concentração de ácido úrico chegou a 511% da observada no grupo controle. Quando comparados entre si, os moluscos infectados expostos atingiram um percentual de 870% do valor dos moluscos não infectados expostos. Entre os 14 e 21 dias esses valores atingiram os pontos mais altos, com 3.650 e 2.700%, respectivamente, para os grupos de moluscos expostos comparados. Enquanto os valores percentuais para seus respectivos controles foram de 17 e 20% para os moluscos não infectados expostos e 900 e 810% para os infectados expostos, na sequência dos períodos citados. Por fim, entre os 28 e 35 dias, a relação entre os grupos expostos e seus grupos controle, foi de 136 e 22% para os moluscos não infectados e controle negativo; 2.500 e 1.771% para os moluscos infectados expostos e controle positivo. Quando comparados entre si, os moluscos infectados expostos apresentaram 667 e 775% da concentração dos moluscos não infectados expostos.

Na tabela 10 estão os valores dos níveis de uréia circulante na hemolinfa dos caramujos tratados com o látex. Os grupos de *B. glabrata* expostos ao látex apresentaram valores elevados no período de 0,5 e 1,5 dias de exposição, como o grupo de moluscos não infectados que ao 0,5 dia obteve um valor de 22.3 mg/dl. Além do grupo dos moluscos expostos infectados com *S. mansoni* que apresentou 17 mg/dl no mesmo período.

Em ambos os grupos os valores tanto da concentração dos níveis de ácido úrico como de uréia foram semelhantes no período de 0,5 a 1,5 dias. No primeiro caso, os valores apresentaram-se baixos. Variando de 0,3 a 1,5 mg/dl para o grupo de moluscos não infectados expostos; e de 0,3 a 0,4 para o grupo de caramujos infectados expostos, no mesmo período.

Contudo, para o período de 7 a 35 dias verificou-se um comportamento diferente entre os mesmo grupos. Os caramujos que compunham o grupo dos expostos ao látex não infectados mantiveram as concentrações sem variações extremas, porém estatisticamente significantes, quando comparadas ao controle negativo. O que ocorre ao contrário, com os moluscos do grupo dos expostos ao látex e infectados, os valores seguiram uma elevação que variou entre 7,3 mg/dl a 12,4 mg/dl no período referido (Tabela 10).

Quando a mesma comparação dos períodos observados foi feita para as concentrações de uréia verificou-se que para o grupo de caramujos submetidos à solução aquosa do látex no intervalo de 0,5 a 1,5 dias, o nível de uréia apresentou seu pico logo com 0,5 dia de aplicação, com o valor de 22,3 mg/dl; mas em seguida observou-se uma queda nas 24 horas consecutivas, quando os valores chegam a 14,0 e 4,4 mg/dl, respectivamente, a cada 12 horas de intervalo. Para os moluscos infectados pelo *S. mansoni* e submetidos à solução aquosa do látex, o comportamento das concentrações foi semelhante; o pico também ocorreu com 0,5 dias, com 17,0 mg/dl e decresceu nos períodos subsequentes, no mesmo intervalo de 12 horas cada, com valores de 3,4 e 4,5 mg/dl, respectivamente (Tabela 10).

No entanto, quando as comparações foram feitas no período compreendido entre o 7° e o 35° dia de preparo do látex, quando os moluscos foram expostos por 24 horas, o perfil entre os dois grupos expostos não diferiu. No grupo de indivíduos não infectados expostos, os valores mantiveram-se predominantemente abaixo dos valores observados no grupo controle negativo, tendo um pico no 14° dia, quando atingiu 26,0 mg/dl. Bem como, os exemplares de *B. glabrata* infectadas expostas mantiveram seus valores sempre abaixo do grupo controle negativo, apresentando um pico de concentração no 7° dia que chegou a 13,0 mg/dl, enquanto o controle negativo apresentou 1,2 mg/dl (Tabela 10).

As diferenças percentuais para os moluscos expostos, infectados e não infectados, comparados entre si ou com seus respectivos controles no período de 0,5 a 1,5 dias foi de 371, 95 e 275% para os moluscos não infectados comparados ao grupo controle negativo para as concentrações de uréia na hemolinfa. Os moluscos infectados expostos apresentaram os percentuais de 340, 79 e 90% do valor da concentração de uréia dos moluscos do grupo controle positivo. Quando a comparação foi feita entre os moluscos infectados expostos, observou-se os valores percentuais de 76, 24 e 102% da concentração de uréia dos moluscos não infectados expostos.

Nos períodos compreendidos entre 7 e 35 dias a diferença entre as concentrações dos moluscos expostos entre si e seus controles foram observadas. Com 7 dias os moluscos expostos apresentaram 33% do valor da concentração de uréia do controle negativo, os moluscos infectados expostos obtiveram

3.250% da concentração de uréia dos moluscos do grupo controle positivo. E quando comparados entre si a concentração de uréia dos moluscos infectados foi de 3.250% do valor dos moluscos não infectados expostos. Aos 14 dias estes percentuais seguiram os valores de 171, 129 e 129% de acordo com as comparações anteriores. A partir dos 21 até os 35 dias os valores percentuais das concentrações de uréia dos moluscos não infectados em relação ao grupo controle negativo foram reduzindo gradativamente, seguindo os valores de 47, 27 e 18%, nos períodos de 21, 28 e 35, respectivamente. Já os moluscos infectados expostos apresentaram um comportamento diferente das concentrações, que foram de 129, 316 e 54%, para os respectivos períodos citados. Quando comparados os moluscos infectados expostos à solução os valores seguiram de 129, 431 e 200% da concentração de uréia dos moluscos não infectados expostos.

Tabela 9- Concentração de ácido úrico (mg/dl) na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata*, infectada e não infectada, por *Schistosoma mansoni* exposta ao látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopii*, na concentração de 0,7 mg/l, no período de 0.5 a 35 dias.

Grupos	0.5 dias	1.0 dias	1.5 dias	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias	35 dias
	X ± DP	X ± DP	X ± DP	X ± DP	X ± DP	X ± DP	X ± DP	X ± DP
Não infectados não expostos ao látex	1,0 ± 0,1a	1,3 ± 0,4 a	0,7 ± 0,02a	1,6± 0,02a	1,2 ±0,03a	1,5± 0,06a	1,1 ± 0,2a	7,2± 0,06a
(controle negativo)								
Infectados não expostos ao látex	0,3 ± 0,04b	1,7 ± 0,2a	0,4 ± 0,02b	1,7 ± 0,1a	0,8 ± 0b	1,0 ± 0,2b	0,4 ± 0b	0,7 ± 0b
(controle positivo)								
Não infectados expostos ao látex	0,3 ± 0,04b	0,5 ± 0,1b	1,5 ± 0,03c	1,0 ± 0,2b	0,2 ± 0c	0,3 ± 0,02c	1,5 ± 0c	1,6 ± 0,02b
Infectados expostos ao látex	0,3 ± 0,01b	0,4 ± 0,01b	0,3 ± 0,01b	8,7 ± 0,07c	7,3 ± 0,2d	8,1 ± 0,2d	10,0 ±0,1d	12,4 ± 0,8c

Sendo X a média, DP o desvio padrão. Letras distintas indicam médias diferentes entre si, quando comparadas ao grupo controle, p<0,05.

Tabela 10 - Concentração de uréia (mg /dl) na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata*, infectada e não infectada, por *Schistosoma mansoni* exposta ao látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopii*, na concentração de 0,7 mg/l, no período de 0.5 a 35 dias.

Grupos	0.5 dias	1.0 dias	1.5 dias	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias	35 dias
	X ± DP	X ± DP	X ± DP	X ± DP	X ± DP	X ± DP	X ± DP	X ± DP
Não infectados não expostos ao látex	6,0 ± 0,08 a	14,7 ± 0,7a	16,0 ± 0,5a	1,2 ± 0a	15,2 ± 2,5a	15,0 ± 2,3a	16,4 ± 0,1a	17,0 ± 0,06a
(controle negativo)								
Infectados expostos ao látex	5,0 ± 0,6b	4,5 ± 0,2b	5,0 ± 0,2b	0,4 ± 0a	5,6 ± 0,2b	7,0 ± 0,3b	6,0 ± 0,2b	11,2 ± 0,1b
(controle positivo)								
Não infectados expostos ao látex	22,3 ± 0,2b	14,0 ± 1,4a	4,4 ± 0,5b	0,4 ± 0a	26,0 ± 1,4c	7,0 ± 0,1b	4,4 ± 0,3c	3,0 ± 0,4c
Infectados expostos ao látex	17,0 ± 0,6c	3,4 ± 1,3b	4,5 ± 0,1b	13,0 ± 0,6b	8,0 ± 0,3b	9,0 ± 0,2b	19,0 ± 0,4d	6,0 ± 0,4d

Sendo X a média, DP o desvio padrão. Letras distintas indicam médias diferentes entre si, quando comparadas ao grupo controle, $p < 0,05$.

Sabe-se que nos moluscos pulmonados aquáticos a produção de amônia é quatro vezes maior do que a de uréia. E quando em situações de estresse, há uma queda de até 22% na produção de amônia ou esta pode manter-se constante; há também uma elevação na excreção de uréia, mas quando este ciclo chega a um estágio de esgotamento a excreção de produtos nitrogenados pode ser feita a partir de ácido úrico. Em 1980, Becker observou que durante a inanição e a infecção por larvas de trematódeos, a proteólise é aumentada e a maioria dos produtos nitrogenados é, parcialmente, excretada via ativação do ciclo da ornitina (SCHMALE & BECKER, 1977; BECKER & SHMALE, 1978; MEYER & BECKER, 1980). Sendo neste momento que encontra-se o ponto máximo da produção de uréia. De maneira que a amônia produzida pelo molusco deva ser detoxificada por meio da via das purinas, como o ácido úrico, e sendo esta via energeticamente dispendiosa, o molusco perde muita energia com o processo de desintoxicação. Em 1979, Stanislawsky *et al.* observaram a redução do conteúdo do aminoácido responsável pela síntese das purinas e da uréia, o ácido aspártico, na hemolinfa de *B. glabrata* infectada por *S. mansoni*, e reforçaram a idéia de que a elevação dos níveis dos produtos nitrogenados acaba saturando o mecanismo de detoxificação via uréia e leva o molusco a excretar ácido úrico.

A degradação de proteínas desencadeada como resposta ao estresse causado pela exposição ao látex de *E. splendens*, no presente estudo, levou a mudança nas concentrações dos produtos nitrogenados de excreção. Pode-se observar que no começo do processo de intoxicação os moluscos apresentavam um perfil ureotélico modificado, com concentrações mais altas no 1º dia de exposição ao látex. As concentrações de ácido úrico sugerem que nos períodos de maior concentração de uréia, os produtos nitrogenados foram eliminados sob a forma de ácido úrico, uma vez que é a forma menos tóxica para os moluscos aquáticos. No entanto, conforme citado acima, os moluscos quando fisiologicamente estressados, realizam processos compensatórios para melhor regular suas vias basais do metabolismo, de forma que no momento que a via de excreção ureotélica está saturada e o molusco passa a excretar ácido úrico em maior concentração. Sendo assim, os níveis compensados apresentados nas tabelas 9 e 10 sugerem este tipo de comportamento apresentado pelos moluscos analisados.

5- CONCLUSÕES

5.1- Aspectos da Biologia Reprodutiva de *Biomphalaria glabrata*

- A solução aquosa feita a partir do látex de *E. splendens* var. *hislopii* permanece ativa e altamente letal a espécie *B. glabrata* por 3 dias.
- A associação da intoxicação pelo látex com a infecção por *Schistosoma mansoni* resultou em uma situação de estresse, na qual é comum a postura de ovos inviáveis.
- A infecção por *Schistosoma mansoni* aumenta o número de danos às funções reprodutivas de *Biomphalaria glabrata* exposta ao látex, se alterando de maneira mais vigorosa nos moluscos expostos aos dois fatores de estresse. Os moluscos infectados apresentaram alterações mais drásticas do que aqueles somente expostos ao látex, tornando-se mais susceptíveis a ação do mesmo.

5.2 - Alterações nas reservas energéticas de *Biomphalaria glabrata* infectada por *Schistosoma mansoni* associada ao tempo de degradação do látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopii*.

- A ação do látex surtiu efeito sobre os depósitos de glicogênio dos moluscos expostos. E os moluscos, que além desse fator, ainda estavam parasitados pelo *S. mansoni* apresentaram alterações na sua fisiologia significativamente diferentes daqueles apenas expostos ao látex. A ação de moluscidas à base de soluções vegetais pode assumir um caráter seletivo.
- Ao serem mobilizados, seja pelas larvas de trematódeos (nos moluscos infectados) seja pelo próprio molusco para esforço reprodutivo ou de crescimento em resposta ao estresse; a glicose aumentou na circulação hemolinfática nos mesmos intervalos onde as reservas de glicogênio foram reduzidas nos tecidos estudados.

- Os níveis de proteínas totais não variaram significativamente, indicando que há um provável processo de ativação das vias metabólicas básicas, onde há o uso de proteínas e aminoácidos para produção de energia.
- A exposição ao látex aquoso de *E. splendens* var. *hislopii* resultou em alterações significativas nas concentrações de produtos nitrogenados de degradação, sugerindo uma mudança do padrão ureotélico para uricotélico nos moluscos expostos e infectados.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEWUNMI, C. O.; BECKER, W.; DORFLER, G. Effect of prolonged administration of sublethal concentrations of aridan isolated from *Tetrapleura tetraptera* and bayluscide on the glycogen and protein content of *Biomphalaria glabrata*. *J. Ethnopharmacol*, v.24, p.107- 114,1988.

ALCANFOR, J. D X. *Ação de extratos de plantas do cerrado sobre Biomphalaria glabrata (Say, 1818) hospedeiro intermediário de Schistosoma mansoni (Sambom,1907)*. Goiânia/Goiás. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, 84p. Dissertação de Mestrado. 2001.

ALVES, T. M. A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S. M.; SMÂNIA, E. F.; JÚNIOR, A. S.; ZANI, C. L. Biological screening of brazilian plants. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.95, n.3 p.367-373, 2000.

AMARAL, R. S.; PORTO, M. A. S. Evolução e situação atual do controle da esquistossomose no Brasil. *Rev. Soc. Br. Med. Tropical* v.27 suppl III p. 73-90, 1994.

AMORIM, J. P. Infecção experimental e natural de murídeos pelo *Schistosoma mansoni* [nota prévia]. *Rev. Bras. Malac.* v. 5 p. 219-222, 1953.

AMORIM, J. P.; PESSOA, S. B. Experiência de alguns vegetais como moluscocida. *Rev. Br. Malariologia Doenças Tropicais* v.14 p.255-260, 1962.

ANDREWS, P.; THYSSEN, J.; LORKE, D. The biology and toxicology of molluscicide, Bayluscide®. *Pharmacol Ther* v.19 p.245-295, 1983.

ANSARI, N. *Epidemiology and control of schistosomiasis (bilharziasis)*. S. Karge EUA, 420pp, 1973.

ANTUNES, C. M. F. *Nectomys squamipes squamipes* Brants, 1827 na epidemiologia da esquistossomose mansoni. 1971. Dissertação (Ciências Biológicas). Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, 1971.

ARAÚJO, S. M.; PILE, E. A. M.; BARROS, J.S. L.; SANTOS, J.A. A; VASCONCELLOS, M. C. Alterações histológicas em *Lymnaea columella* provocadas pelo látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopii*. *Braz J Vet Res Anim Sci.* v.39 p.157-159, 2002.

ARCHIBALD, R. G. The use of the fruit of the tree *Balanites aegyptiaca* in the control of schistosomiasis in the Sudan. *Transaction Royal Soc Trop Med Hyg* v.27 n.2 p.207-210, 1933.

APERS, S.; BARONIKOVA, S.; SINDAMBIWE, J. B.; WITVROUW, M.; De CLERQ, E.; BERGERE, D. V.; MARCK, E. V.; VLIETINCK, A.; PIETERS, L. Antiviral, haemolytic and molluscicidal activities of triterpenoid saponins from *Maesa lanceolata*: establishment of structure-activity relationships. *Planta Medica* v.67 p.528-532, 2001.

BAPTISTA, D. F.; VASCONCELLOS, M. C.; LOPES, F. E. F.; SILVA, I. P.; SCHALL, V. T. Evaluation of the molluscicidal property of *Euphorbia splendens* var. *hislopii* (N.B.E.) (Euphorbiaceae): Investigation in lotic habitat. *Mem Inst Oswaldo Cruz* v.87 p.549-553, 1992.

BARBOSA, F. S.; BARBOSA, I.; ARRUDA, F. *Schistosoma mansoni*: natural infection of cattle in Brazil. *Science* v. 138 p. 831, 1962.

BARBOSA, F. S. Natural infection with *Schistosoma mansoni* in small mammals trapped in the course of a schistosomiasis control project in Brazil. *J. Parasitol.* v. 58 p.405-407, 1972.

BARBOSA, N. D. C.; PIMENTEL-SOUZA, F. C.; SAMPAIO, I. B. M. The effect of sasonal, temperature and experimental illumination on reproductive rate

in the snail *Biomphalaria glabrata*. *Brazilian Journal Med Biol Res* v.20 p.685-696,1987.

BARBOSA, F.; SIMÕES – BARBOSA, C. The bioecology of snail vectors for schistosomiasis in Brazil. *Cadernos de Saúde Pública* v.10 n.02 p.200-209, 1994.

BRASIL, CONSELHO DO DESENVOLVIMENTO SOCIAL. Programa especial de controle da esquistossomose. Rio de Janeiro, VDS, 1976.

BECKER W. Metabolic interrelationships of parasitic trematodes and molluscs, especially *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*. *Z Parasitenkd* v.63 p.101-111, 1980.

BECKER, W. Purine metabolism in *Biomphalaria glabrata* under starvation and infection with *Schistosoma mansoni*. *Comp Biochem Physiol* v.76 B p.215-219, 1983.

BERGQUIST, R. N. Schistosomiasis: from risk assessment to control. *TRENDS in Parasitology* v. 18 p 309-314, 2002.

BEZERRA, J. C. B.; KEMPER, A.; BECKER, W. Profile of organic acid concentrations in the digestive gland and hemolymph of *Biomphalaria glabrata* under estivation. *Mem Inst Oswaldo Cruz* v.94 p. 779-784, 1999.

BEZERRA, J. C. B.; SILVA, I. A.; FERREIRA, H. D.; FERRI, P. H.; SANTOS, S. C. Molluscicidal activity of against *Biomphalaria glabrata* of Brazilian Cerrado medicinal plants. *Fitoterapia* v.73 p.428-430, 2002.

BOYLE, J. P.; YOSHINO, T. P. The effect of water quality on oviposition in *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Planorbidae), and a description of the stages of the egg-laying process. *Journal of Molluscan Studies* v.66 p.83-93, 2000.

CAMERON, T. W. M. A new definitive host for *Schistosoma mansoni*. *Journal Helminth* v. 6 p. 219-222, 1928.

CHANDLER, A. C. Control of liver fluke diseases by destruction of the intermediate host. *J. Agric. Res* v.20 p.193-208, 1920.

CHENG, T. C.; SNYDER, Jr. R. W. Studies on host-parasite relationship between larval trematodes and their hosts. IV. A histochemical determination of glucose and its role in the metabolism of molluscan host and parasite. *Transaction of the American Microscopical Society*, v. 82, p. 343-346, 1963.

CHENG, T. C.; LEE, F. O. Glucose levels in the mollusk *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni* . *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 18, p. 395-399, 1971.

CHENG, T. H. Schistosomiasis in mainland China: a review of research and control programs since 1949. *American Journal Tropical Medicine Hygiene* v.20 p.26-53, 1971.

CHIANG, P. K. Glycogen metabolism in the snail *Biomphalaria glabrata*. *Comp. Biochem. Physiol* v. 58 B: p. 9-12, 1977.

COOPER, L. A.; RICHARDS, C. S; LEWIS, F. A.; MINCHELLA, D. J. *Schistosoma mansoni*: relationship between low fecundity and reduced susceptibility to parasite infection in the snail *Biomphalaria glabrata*. *Experimental Parasitology* v.79 p.21-28, 1994.

COUSIN, C.; OFORI, K.; ACHOLONOU, S.; MILLER, A.; RICHARDS, C.; LEWIS, F.; KNIGHT, M. *Schistosoma mansoni*: changes in the albumen gland of *Biomphalaria glabrata* snails selected for nonsusceptibility to the parasite. *Journal of Parasitology* v. 81 n.6 p.905-911, 1995.

CREWS, A. E.; YOSHINO, T. P. *Schistosoma mansoni*: effect of infection on reproduction and gonadal growth in *Biomphalaria glabrata*. *Experimental Parasitology* v.68 p.326-334, 1989.

CREWS, A. E.; YOSHINO, T. P. Influence of larva schistosomes on polysaccharide synthesis in albumen glands of *Biomphalaria glabrata*. *Parasitology*, v. 101, p 351-359, 1990.

CREWS, A. E.; YOSHINO, T. P. *Schistosoma mansoni*: influence of infection on levels of translatable mRNA and on polypeptide synthesis in the ovotestis and albumen gland of *Biomphalaria glabrata*. *Experimental Parasitology* v.72 p.368-380, 1991.

DAVIS, A.; WIGNER, D. H. Multicentre trials of praziquantel in human schistosomiasis: design and techniques. *Bull. Wld. Hlth. Org.* v.57, p. 767-771, 1979.

De CARVALHO, R. R.; MALDONADO, J. R. A.; OLIVEIRA-FILHO, E. C.; RIBEIRO, A. C.; PAUMGARTTEN, F. J. R.; REY, L. Effect of *Euphorbia milii* latex on *Schistosoma mansoni* eggs, miracidia and cercariae. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* v.93 suppl I p.235-237, 1998.

De JONG-BRINK, M. The effect of desiccation and starvation upon weight, histology and ultrastructure of the reproductive tract of *Biomphalaria glabrata*, intermediate host of *Schistosoma mansoni*. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, v. 136, p. 229-262, 1973.

De JONG-BRINK M.; BERGAMIN-SASSEM, M.; SOLIS-SOTO, M. Multiple strategies of Schistosomes to meet their requirements in the intermediate snail host. *Parasitology* v.123 (suppl) p. 129-141, 2001.

DUNCAN, J. A review of the development and application of molluscicides in Schistosomiasis control. *Academic Press*. v. 01, p.4-40, 1974.

EL SAADANY, M. M.; MOHAMED, A. M. Effect of the infection with *Trichobilharzia ocellata* and *Schistosoma mansoni* on the ultrastructure of the albumen gland of their respective hosts, *Lymnaea stagnalis* and *Biomphalaria glabrata*. *Folia Morphology* v.37 p. 264-273, 1989.

FEEMA- FUNDAÇÃO ESTADUAL DE ENGENHARIA E MEIO AMBIENTE. Métodos de Análises Físico-Químicas da Água, vol. III, *Série Didática*, 14/79, DICOMT, Rio de Janeiro, 1979.

FENWICK, A. Baboons as reservoirs host of *Schistosoma mansoni*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* v. 63 p. 557-567, 1969.

FREITAS, C. A. Situação atual da esquistossomose no Brasil. *Rev. Brasil. Malariol. D. Trop.* v. 24, p. 3-63, 1972.

GENTILINI, M. Traitement de la bilharziose urinaire et intestinale par le praziquantel. *Bull. Soc. Path. Exot.* v. 75, p.523-529, 1982.

GEREATS, W. P. Neurohormonal control of growth and carbohydrate metabolism by the light green cells in *Lymnaea stagnalis*. *General and Comparative Endocrinology*, v. 86, p. 433-434, 1992.

GIOVANELLI, A.; SILVA, C. L. P. A. C.; VASCONCELLOS, M. C.; MEDEIROS, L.; SOARES, M. S. The molluscicidal activity of Crown of Christ (*Euphorbia splendens* var. *hislopii*) latex on *Melanoides tuberculata* (Thiaridae), an associated snail to *Biomphalaria glabrata* (Planorbidae) habitats. *Proceedings of VII International Symposium on Schistosomiasis*, p.169. Rio de Janeiro, 1999.

GONNERT, R. Results of laboratory and field trials with the molluscicide Bayer 73. *Bull Wld Hlth Org* v.25 p.483-501,1961.

GRAULT CE. *Life table analysis to compare different brazilian species of Biomphalaria*. Report submitted for upgrading assessment for PhD degree. London School of Hygiene and Tropical Medicine.41p, 1992.

HAAS, W.; GUI, M.; HARBEL, B.; STROBEL, M. Miracidia os *Schistosoma japonicum* approach and attchmente to the snail host. *J Parasitol*, v. 77, p. 509-513, 1991.

HODASI, J. K. M. The effects of *Fasciola hepatica* on *Lymnaea stagnalis*. *Parasitology*, v. 65, p. 359-369, 1972.

HOSTETTMANN, R. On the use of plants and plants derived compus for control os Schistosomiasis. *Naturwissenschaften*. v. 71. P. 247-251, 1984.

HUNTER, J. M.; REY, L.; SCOTT, D. Man- made lakes and man-made diseases towards a policy resolution. *Soc. Sci. Med.* v. 16, p. 1127-1145, 1982.

HURD, H. Host fecundity reduction: a strategy for damage limitation?. *Trends in Parasitology* v.17 n.8 p.363-368, 2001.

IAROTSKI, L. S.; DAVIS, A. The schistosomiasis problem in the world: result of WHO questionnaire surves. *Bull. Wld Haelth Org.* v. 59 p. 119-127, 1982.

IAVORSKII, I. P. Interaction in the *Fasciola hepatica*-water snail system. *Parazitologiiia*, v. 23, p. 355-358, 1989.

JOOSSE, J.; van ELK, R. *Trichobilharzia ocellata*: phisiologycal characterization of growth, glycogen depletion, and absence of reproductive activity in the intermediate snail host, *Lymnaea stagnalis*. *Experimental Parasitology*, v. 62, p. 1-13, 1986.

JOOSSE, J. The hormone mollusc, p. 89-140. In: Janfer, H. & Dwner, R. G. H. (eds). *Vertebrate Endocrinology*, vol. 2. Academic Press., New York, pp. 452, 1988.

JORDAN, P & WEBBE, G. Schistosomiasis epidemiology treatment and control London. *W. Heinemann Medical Books*, 435pp, 1982.

JURBERG, P.; VASCONCELLOS, M. C.; MENDES, N. M. Plantas empregadas como moluscicidas: uma visão crítica. *Mem Inst Oswaldo Cruz* v.84suppl I p.76-83, 1989.

KALBE, M; HABERL, B.; HAAS, W. Miracidal host-fiding in *Fasciola hepatica* and *Trichobilharzia ocellata* is stimulated by species-specific glicoconjugates released from the host snails. *Parasitol Res*, v. 83, p. 806-812, 1997.

KAWAZOE, U. Alguns aspectos da Biologia de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) e *Biomphalaria tenagophila* (Dorbigny, 1835) (Pulmonata, Planorbidae). II- fecundidade e fertilidade. *Revista de saúde pública São Paulo* v.11 p.47-64, 1977.

KATZ, N. Experiências com quimioterapia em grande escala no controle da esquistossomose no Brasil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*. v. 22, p. 40-51, 1980.

KATZ, N.; ROCHA, R. S.; CHAVES, A. Clinical trails with praziquantel in schistosomiasis mansoni. *Rev.Inst. Med. S. Paulo*. v. 23, p. 72-78, 1981.

KLOSS, H.; McCULLOUGH, F. S. Plant molluscicides. *Planta Medica* v.46 p.195-209, 1982.

KLOOS, H.; SOUZA, C. P.; GAZZINELLI, A.; SOARES-FILHO, B. S.; TEMBA, P. C.; BETHONY, J.; PAGE, K.;GRZYWACZ, C.; LEWIS, F.; MINCHELLA, D.; LOVERDE, P.; OLIVEIRA, R. C. The distribution of *Biomphalaria* spp. In the different habitats in relation to physical, biological,

water contact and cognitive factors in a rural area in Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* v.96 p.57-66, 2001.

KUNTZ, R. E. Natural infection of an Egyptian gerbil with *Schistosoma mansoni*. *Proc. Helminth. Soc. Wash.* v. 50 p. 39-48, 1952.

LIVINGSTONE, D. R.; de ZWAAN A. Carbohydrate Metabolism of Gastropods. In: Hochachka PW. *The Mollusca*. Metabolic Biochemistry and Molecular Biomechanics. USA: Academic Press vol 1 pp. 177-242, 1983.

LOKER, D. L.; ETGES, F. J. Effect of *Schistosoma mansoni* infection on fecundity and perivitelline fluid composition in *Biomphalaria glabrata*. *Journal of Parasitology* v. 65 n.6 p.880-885, 1979.

LUGT, C. B. Feasibility of growth and productions of molluscicidal plants. In: Mott KE, *Plant Molluscicides*, UNDP/ World Bank/WHO, John Wiley & Sons, New York, p. 231-244, 1987.

LYDDIARD, J. R. A.; WHITFIELD, P. S. Inhibition of site I mitochondrial electron transport by extract of the seeds *Milletia thornningii*: a potential mechanism for the plant's molluscicidal and schistosome larvicidal activity. *Journal of Helminthology* v.75 p.259-265, 2001.

McCULLOUGH, F. S. Snails control in relation to a strategy for reduction of morbidity due Schistosomiasis. *Trop. Med. Parasitol.* v. 37, p. 181-184, 1986.

McCULLOUGH, F. S. The role of mollusciciding in Schistosomiasis Control. *WHO 92/107* 34pp, 1992.

MACHADO, P. A. The Brazilian Program for Schistosomiasis Control 1975-1979. *Am J Trop Med Hyg* v.31 n.1 p.76-86,1982.

MAGALHÃES, L.A.; De LUCCA, O. Determinação do período de desenvolvimento e da viabilidade das desovas de duas populações de

Biomphalaria glabrata e *Biomphalaria tenagophila* (Mollusca, planorbidae).
Revista da Sociedade de Medicina Tropical v.5 n.6 p.307-313, 1971.

MANTAWY, M. M. Potential effect of *Allium cepa* and *Allium sativum* on hemolymph of *Biomphalaria alexandrina*, the intermediate host of *Schistosoma mansoni*. *J Egypt Soc Parasitol* v.32 n.1 p.271-283, 2001.

MELLO-SILVA, C. C. *Cruzamentos interespecíficos entre planorbídeos hospedeiros intermediários do Schistosoma mansoni no Brasil*. 1996. 94f. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) Fundação Oswaldo Cruz – IOC, Rio de Janeiro, 1996.

MELLO-SILVA, C. C.; GRAULT, C. E.; COSTA, V. A.; BARBOSA, F. S. Possible hybridization of Brazilian planorbid snails and its importance in population dynamics. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* v.93 p.227-232, 1998.

MELLO-SILVA, C. C. Alterações fisiológicas em *Biomphalaria glabrata* SAY, 1818 (PULMONATA: PLANORBIDAE), hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni* SAMBOM, 1907 (TREMATODA: SCHISTOSOMATIDAE) expostas ao látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopii* N.E.B (EUPHORBIACEAE). 2005. 88f. Tese (Doutorado em Ciências veterinárias) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

MELLO-SILVA, C. C.; VASCONCELLOS, M. C.; PINHEIRO, J; RODRIGUES, M. L. A Physiological changes in *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (Pulmonata: Planorbidae) caused by sub-lethal concentrations of the latex of *euphorbia splendens* var. *hislopii* N. E. B (Euphorbiaceae). *Men. Inst. Oswaldo Cruz* v. 10 n. 1 p. 3-8, 2006a.

MELLO-SILVA, C. C.; LIMA, M. G.; PINHEIRO, J.; BEZERRA, J. C. B.; RODRIGUES, M. L. A. Alterações fisiológicas em *Biomphalaria glabrata*

tratadas com extratos bruto de *Solanum malacoxylum*. *Ciência Animal* . v. 16 n. 2 p. 61-70, 2006b.

MELLO-SILVA, C. C.; VILAR, M. M.; BEZERRA, J. C. B.; VASCONCELLOS, M. C.; PINHEIRO, J.; RODRIGUES, M. L. A. Reproductive activity alterations on the *Biomphalaria glabrata* exposed to *Euphorbia splendens* var. *hislopii* latex. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* v. 102 n. 6 p. 671-674, 2007.

MENDES, N. M.; PEREIRA, J. P.; SOUZA, C. P.; OLIVEIRA, M. L. L. Ensaio preliminar em laboratório para verificar a ação moluscicida de algumas espécies da flora brasileira. *Rev Saúde Públ/São Paulo* v.18 p.348-354,1984.

MENDES, N. M.; BAPTISTA, D. F.; VASCONCELLOS, M. C.; SCHALL, V. T. Evaluation of the molluscicidal properties of *Euphorbia splendens* var. *hislopii* (N.E.B.) (Euphorbiaceae) – 1- Experimental test in a lentic habitat. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* v.87 n.1 p.21-23, 1992.

MENDES, N. M.; VASCONCELLOS, M. C.; BAPTISTA, D. F.; ROCHA, R. S.; SCHALL, V. T. Evaluation of the molluscicidal properties of *Euphorbia splendens* var. *hislopii* (N.E.B.) latex: experimental test in an endemic area in the state of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* v.92 n. 5 p.719-724, 1997.

MEYER, R.; BECKER, W. Induce urea production in *Biomphalaria glabrata*, a snail host of *Schistosoma mansoni*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 66a, p. 137-677, 1980.

MINCHELLA, D. J. Host life-history variation in response to parasitism. *Parasitology* v.90 p.205-216, 1985.

MODENA, C. M.; COELHO, P. M. Z. BARBOSA, F. S.; LIMA, W. S. Transmission of *Schistosoma mansoni* under experimental conditions using the

bovine - *Biomphalaria glabrata* – bovine model. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* v. 35 p. 11-16, 1993.

MODENA, C. M.; LIMA, W. S.; COELHO, P. M. Z. Wild and domesticated animals as reservoirs of *Schistosoma mansoni* in Brazil. *Acta Tropica* v. 108 p. 242-244, 2008.

MOHAMED, M. M. Effect of *Echinostoma liei* infection on alterations of proteins content and some enzymes in *Biomphalaria alexandrina* snails. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, v. 32, p. 361-372, 2002.

MORGAN, S. A. T.; DE JONG, R. J.; SNYDER, S. D.; MKOJI, G. M.; LOKER, E. S. *Schistosoma mansoni* and *Biomphalaria* : past history and future trends. *Parasitology* v.123 p.211-228, 2001.

MOTT, K. E. *Plant Molluscicides*. UNDP/World Bank/WHO, John Wiley & Sons, New York, pp.326,1987.

MUELEMAN, E. A. Host-parasite interrelation between the freshwater pulmonate *Biomphalaria pfeifferi* and the trematodes *Schistosoma mansoni*. *Zeitschrift fur Parasitenkunde*, v. 43, p. 1-16, 1972.

NELSON, G. S. *Schistosoma* infections as zoonoses in Africa. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* v. 54 p. 301-316, 1960.

OLIVEIRA-FILHO, E. C.; De CARVALHO, R. R.; PAUMGARTTEN, F. J. R. The influence of environmental factors on the molluscicidal activity of *Euphorbia milii* latex. *Journal of Environmental Science Health* v.34 n.2 p. 289-303, 1999.

OMS. Epidémiologie de La schistosomiase et lutte contre cette maladie: situation actuelle et priorités en matière de recherche. *Bull. Org. Mond. Santé.* v. 56, p. 859-868, 1978.

PARAENSE, W. L.. Estudo atual da sistemática dos planorbídeos brasileiros. *Arquivos do Museu Nacional* v.55 p.105-128, 1975.

PARAENSE, W. L.. The sites of cross and self- fertilization in planorbid snails. *Revista Brasileira de Biologia*. V.36 p.535-539, 1976.

PARAENSE WL. Distribuição dos caramujos no Brasil. IN: Reis FA et al. Modernos conhecimentos sobre a esquistossomose mansônica. *Biblioteca da Academia Mineira de Medicina*. P. 117-128, 1986.

PARAENSE, W. L. Planorbídeos e outros moluscos hospedeiros de helmintos. *In: Rey L. Parasitologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 3ª ed. Cap.63 p. 769-783, 2001.

PATIENCE, R. L.; THOMAS, J. D.; STERRY, P. R. Production and release of carboxylic acids during oxic and anoxic metabolism by the pulmonate snail *Biomphalaria glabrata* (Say). *Comp Biochem Physiol* v. 76B p. 253-262, 1983.

PEREIRA, J. P.; SOUZA, C. P. Ensaio preliminares com *Anacardium occidentale* como moluscicida. *Ciência e Cultura* v.26 n.11 p.1054-1057, 1974.

PIERI, O. S. Perspectivas no controle ambiental dos moluscos vetores da Esquistossomose. *In BARBOSA, F. S. Tópicos em Malacologia Médica*. Ed. FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 314pp, 239-252, 1995.

PILE, E. A. M.; PASTOR, N.; SANTOS, J. A.; BARROS, J. S. L. Aspectos histopatológicos de *Biomphalaria glabrata* Say, 1817, hospedeiro intermediário de *Schistosoma mansoni*, submetida a niclosamida. *Braz. J Vet. Res Anim Sci* v.39 n.4 p.218-219,2002.

PIMENTEL-SOUZA, F.; BARBOSA, N. D. C.; RESENDE, D. F. Effect of temperature on the reproduction of the snail *Biomphalaria glabrata*. *Brazilian Journal of Med Biol Res* v. 23 p.441-449, 1990.

PINHEIRO, J.; AMATO, S. B. *Eurytrema coelomaticum* (Digenea: Dicrocoelidae): the effect of infection on carbohydrate contents of its intermediate snail host, *Bradybaena similaris* (Gastropoda, Xanthonychidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* v.89 p. 407-410, 1994.

PINHEIRO, J.; GOMES, E. M. A method for glycogen determination in molluscs. *Arq. Bras. Biol. Tecnol.* v.37 p.569- 576,1994.

PINHEIRO, J.; MALDONADO, A.; LANFREDI, R. M. Physiological changes in *Lymnaea columella* (Say, 1817) (Mollusca, Gastropoda) in the response to *Echinostoma paraensei* Lie and Basch, 1967 (Trematoda: Echinostomatidae) infection. *Parasitol Research*, v. 106, p. 55-59, 2009.

PINTO, C.; ALMEIDA, A. F. Um novo método para profilaxia da esquistossomose mansoni. *Memória do Instituto Oswaldo Cruz* v.40 n.3 p. 291-311, 1944.

REE, G. H. Schistosomiasis and human behavior. *Ecology of Disease*. v. 01, p. 131-133, 1982.

REY, L. Prevenção dos riscos para a saúde decorrente dos empreendimentos hidráulicos. *Rev. Med. Moçambique*. v. 01, p. 55-62, 1982.

REY, L. Schistosomiase em Tunisie; résultats apres dix ans de lutte conte l'endemie. *Bull. Soc. Patholog. Exot.* v. 75, p. 505-522, 1982.

REY, L. *Parasitologia*. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 4ª ed. 820pp, 2008.

RICHARDS, C. S.; MERRITT, I. W. Genetic factors in the susceptibility of juvenile *Biomphalaria glabrata* to *Schistosoma mansoni* infection. *American Journal Tropical Medicine and Hygiene* v.21 n.4 p. 425-434, 1972.

RICHARDS, C. S.; KNIGHT, M.; LEWIS, F. A. Genetics of *Biomphalaria glabrata* and its effect on the outcome of *Schistosoma mansoni* infection. *Parasitology Today* v.8 n.5 p.170-174, 1992.

RITCHIE, L. S. Chemical control of snails. In: Anssari N. *Epidemiology and Control Schistosomiasis*. Basel: S Karger p485-532, 1973.

ROSADO, O.; MONTEIRO, W.; CALDAS, R. A. Estudo do metabolismo de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Mollusca, gastropoda) em estivação. *Experimental* v.29 n.1 p.1-17, 1983.

ROUQUAYROL, M. Z.; SOUSA, M. P.; SILVA, M. J. M. Atividade moluscicida de plantas do nordeste Brasileiro (III). *Revista Brasileira de Farmácia* v.53 p.215-220, 1972.

ROUQUAYROL, M. Z.; SOUSA, M. P.; MATOS, F. J. A. Atividade moluscicida de *Pithecellobium multiflorum*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* v.7 p.11-19, 1973.

RUG, M.; RUPPEL, A. Toxic activities of the plant *Jatropha curcas* against intermediate snail hosts and larvae of schistosomes. *Tropical Medicine International Health* v.5 n.6 p.423-430, 2000.

SANTHANAGOPALAN V.; YOSHINO T. Monoamines and their metabolites in the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* v.125 p.469-478, 2000.

SANTOS, A. F.; SANT'ANA, A. E. G. Molluscicidal properties of some species of *Annona*. *Phytomedicine* v.8 n.2 p.115-120, 2001.

SÃO LUIZ, J B. *Efeito do látex de Euphorbia splendens var. hislopii sobre Lymnaea columella (Say, 1817) infectadas e não infectadas com miracídios de Fasciola Hepatica L, 1758*. Universidade federal Rural do Rio de Janeiro, 54p. Dissertação de Mestrado, 2003.

SCHALL, V. T.; VASCONCELLOS, M. C.; VILLAÇA- COELHO, A. L.; FERREIRA-LOPES, F. E.; SILVA, I. P. Evaluation of temporal, seasonal and geographic stability of the molluscicidal property of *Euphorbia splendens* látex. *Rev Inst Med Trop São Paulo* v.34 n.3 p.183-191, 1992.

SCHALL, V.T.; De VASCONCELLOS, M.C.; De SOUZA, C. P.; BAPTISTA, D.F. The molluscicidal activity of Crown of Christ (*Euphorbia splendens* var. *hislopii*) latex on snails acting as intermediate hosts of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium*. *Am J Trop Med Hyg* v.58 p.7-10, 1998.

SCHMALE, H.; BECKER, W. studies on the urea cycle of *Biomphalaria glabrata* during normal feeding activity in starvation and with infection of *Schistosoma mansoni*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 58b, p. 321-330, 1978.

SCHWARTZ, C. F. W.; CARTER, C. E. Properties of glycogen synthase and phosphorylase from *Biomphalaria glabrata* (Mollusca). *Journal of Parasitology* v.68 n.2 p.228-235, 1982.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia de vigilância epidemiológica. Brasília: *Ministério da Saúde*, 2005.

SMINIA, T. Structure and function of blood and connective tissue cells of the freshwater pulmonate *Lymnaea stagnalis* studie by electron microscopy and enzyme histochemistry. *Zeitschrift fur Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, v. 139, p. 497-526, 1972.

SOUSA, M. P.; ROUQUAYROL, M. Z.; SILVA, M. J. M. Atividade moluscicida de plantas do nordeste Brasileiro. *Revista Brasileira de Farmácia* v.51 p.1-19, 1970.

SOUSA, M. P.; ROUQUAYROL, M. Z. Molluscicidal activity of plants from northeast

Brazil. *Revista Brasileira de Pesquisas em Medicina e Biologia* v.7 n.4 p.389-393, 1974.

SOUZA, C. P.; LIMA, L. C. Moluscos de interesse parasitológico do Brasil. *Centro de Pesquisa René Rachou: Fiocruz, BH.* p.76, 1990.

SUBHASH, C; YADAV, M. V.; JAGANNADHAM. Physiological changes and molluscicidal effects of crude latex and Milin on *Biomphalaria glabrata*. *Chemosphere* v. 71, p. 1295-1300, 2008.

SULLIVAN, S. T.; CHENG, T. C.; HOULAND, K. H. Studies on parasite castration of *Ilyanassa obsoleta* (Mollusca, Gastropoda) by several marine trematodes. *Trans Am Microsc Soc* v. 104 p.154-171, 1985.

SUMNER, J. B. The estimation of sugar in diabetic urine using dinitrosalicylic acid. *J Biol Chem* v.62 p.287-290, 1924.

STANISLAWSKY, E.; BECKER, W. Influences of semi-synthetic diets, starvation and infection with *Schistosoma mansoni* (Trematoda) on the metabolism of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda). *Comparative Biochemistry Physiology* v. 63B p.527- 533, 1979.

TANATAWY, A. A. Effect of sublethal concentrations of *Atriplex halimus* (Chenopodiaceae) on *Biomphalaria alexandrina*, the snail-vector of *Schistosoma mansoni* in Egypt. *J Egypt Soc Parasitol* v.32 n.1 p.297-305, 2002.

VASCONCELLOS, M. C.; SCHALL, V. T. Latex of “coroa de cristo”(*Euphorbia splendens*): An effective molluscicide. *Mem Inst Oswaldo Cruz* v.81 n.4 p.475-476,1986.

VASCONCELLOS, M. C. Controle de *Lymnaea columella* (Say, 1817) (Pulmonata: Lymnaeidae), hospedeiro intermediário de *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 (Trematoda: Fasciolidae), com o látex de *Euphorbia splendens*

var. *hislopii* N.E.B. (Euphorbiaceae) no vale do Paraíba/SP. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 141p. Tese de Doutorado,2000.

VASCONCELLOS, M. C.; AMORIM, A. Molluscicidal action of the latex of *Euphorbia splendens* var. *hislopii* N.E.B (“Christ’s Crown”) (Euphorbiaceae) against *Lymnaea columella* (Say, 1817) (Pulmonata:Lymnaeidae), intermediate host of *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 (Trematoda: Fasciolidae). 1- Test in Laboratory. *Mem. Inst Oswaldo Cruz* v.98 n.4 p.557-563,2003a.

VASCONCELLOS, M. C.; AMORIM, A.. Activity of *Euphorbia splendens* var. *hislopii* N.E.B (Euphorbiaceae) latex against *Lymanea columella* (Say, 1817) (Pulmonata: Lymnaeidae), intermediate host of *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 (Trematode: Fasciolidae). 2- Limited field-testing. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* v.98 n.7 p.981-985, 2003b

VEGA, S.G.; GUZMAN, P.; GARCIA, L.; ESPINOSA, J.; CORTINA-DE-NAVA, C. Sperm shape abnormality and urine mutagenicity in mice treated with niclosamide. *Mut Res* v.204 p.269-276, 1988.

THERON, A.;POINTER, J. P.; COMBES, C. Recherches sur les facteurs responsable des densités de cercaire à *Schistosoma mansoni* à Guadeloupe. *Ann. Parasitol.(Paris)*. v. 52, p. 421-433, 1977.

UPATHAM, E. S. Dispersion of St. Lucia *Schistosoma mansoni* cercariae in natural standing and running waters determined by cercaria counts and mouse exposure. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* v. 68, p. 343-352, 1974.

WAGNER, V. A. The possibility eradicating bilharzia by extensive planting of the tree *Balanites*. *South African Medicine* v.10 p10-11, 1936.

WEBBE, G.; LAMBERT. Plants that kill snails and prospect for disease control. *Nature*. v. 302, p.754, 1983.

WEBBE, G. Molluscicides in the control of Schistosomiasis in England Kingdom. *UNDP/ World Bank/ WHO*. v. 01, p. 1-26, 1987.

WIJSMAN, T. C.; WICK-BATENBURG, H. V. Biochemical composition of the eggs of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* and oviposition induced restoration of albumen gland secretion. *International Journal of Invertebrate Reproduction and Development* v.12 p.199-212, 1987.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Epidemiology and control of schistosomiasis. Report of a WHO Expert Committee. *Wld. Hlth. Org. techn. Rep. Ser.* n° 643, 1980.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Report of a scientific Working group on Plant Molluscicide and Guidelines for Evaluation of Plant Molluscicide*. Geneva: World Health Organization, (TDR/SCH-SWE (4)/83.3), 1983.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Prevention and control of schistosomiasis and the soil-transmitted helminthiasis. Geneva: World Health Organization; (Report of a WHO Expert Committee), 2002.

ZANI, C. L.; PASSOS, L. K. L.; SOUSA, C. P.; OLIVEIRA, A. B. Bioassay guided phytochemical study of the latex from *Euphorbia splendens* (Euphorbiaceae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* v.84 suppl I p.254, 1989.

ZANI, C. L.; MARSTON, A.; HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Molluscicidal milliamines from *Euphorbia milii* var. *hislopii*. *Phytochemistry* v.34 n.1 p. 89-95, 1993.