

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

DISSERTAÇÃO

Alterações imunológicas e histopatológicas em *Biomphalaria glabrata* SAY, 1818 (PULMONATA: PLANORBIDAE) infectada por *Schistosoma mansoni* SAMBON, 1907 (TREMATODA: SCHISTOSOMATIDAE) e exposta a concentração subletal do látex de *Euphorbia milii* (syn *splendens*) var. *hislopii* (Euphorbiaceae)

GABRIELA FRIANI VIEIRA TREVISANO

2017



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

**ALTERAÇÕES IMUNOLÓGICAS E HISTOPATOLÓGICAS EM
BIOMPHALARIA GLABRATA SAY, 1818 (PULMONATA:
PLANORBIDAE) INFECTADA POR *SCHISTOSOMA MANSONI*
SAMBON, 1907 (TREMATODA: SCHISTOSOMATIDAE) E EXPOSTA
A CONCENTRAÇÃO SUBLETAL DO LÁTEX DE *EUPHORBIA MILII*
(*SYN SPLENDENS*) VAR. *HISLOPII* (EUPHORBIACEAE)**

GABRIELA FRIANI VIEIRA TREVISANO

Sob a Orientação da Professora
Patrícia Silva Gôlo

e Coorientação da Professora
Clélia Christina Mello-Silva Almeida da Costa

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2017

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

T814a Trevisano, Gabriela Friani Vieira, 1989-
Alterações imunológicas e histopatológicas em
Biomphalaria glabrata SAY, 1818 (PULMONATA:
PLANORBIDAE) infectada por Schistosoma mansoni
SAMBON, 1907 (TREMATODA: SCHISTOSOMATIDAE) e exposta
a concentração subletal do látex de Euphorbia milii
(syn splendens) var. hislopii (Euphorbiaceae) /
Gabriela Friani Vieira Trevisano. - 2017.
45 f.: il.

Orientadora: Patrícia Silva Gôlo.
Coorientadora: Clélia Christina Mello-Silva
Almeida Costa.
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias, 2017.

1. Biomphalaria glabrata. 2. Euphorbia milii. 3.
hemócitos. I. Gôlo, Patrícia Silva, 1987-, orient. II.
Costa, Clélia Christina Mello-Silva Almeida , 1970-
coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. IV.
Título.

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

GABRIELA FRIANI VIEIRA TREVISANO

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências,
no Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinária.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 23/02/2017.



Dra. Patrícia Silva Gôlo - UFRRJ

(Orientadora)



Dra. Maria de Lurdes de Azevedo Rodrigues - UFRRJ



Dra. Marta Júlia Faro dos Santos Costa - FIOCRUZ

Ao meu marido Raphael e ao meu filho Joaquim,
pelo apoio e compreensão nas horas de ausência
e por sempre estarem ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Espiritualidade, pela proteção, amparo e força para seguir em frente e não desistir.

Agradeço a minha família pelo apoio e dedicação. Em especial minha mãe e irmã que tanto me auxiliaram. Aos meus sogros pelo apoio sem fim.

Quero agradecer aos meus amigos, aqueles que são mais que irmãos.

Ao meu marido, minha fortaleza, meu porto seguro, meu amor. Não foi fácil chegar até aqui, sabemos como os últimos anos foram complicados, mas conseguimos juntos. Te amo eternamente!

Ao meu filho Joaquim. Obrigada pelo apoio e por entender a ausência da mamãe. Te amo incondicionalmente!

Aos pesquisadores do Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental (LAPSA)/Instituto Oswaldo Cruz/Fundação Oswaldo Cruz, em especial ao Dr. Maurício Carvalho Vasconcellos e Dr. José Augusto Santos por todo auxílio.

Aos companheiros do Laboratório (LAPSA) Anna Carla Alberto, Ronaldo Carvalho e Vanessa Valladares.

À Dra. Marta Júlia Faro e Vanessa Silva do Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, pelo auxílio fundamental para este trabalho.

À Dra. Ester Mota do Laboratório de Patologia por ter auxiliado na parte histológica deste trabalho.

À Dra. Marcela Figueiredo do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos por toda ajuda prestada e pela parceria firmada. Obrigada por tudo!

Aos professores, pesquisadores e funcionários do curso de pós-graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ, obrigado por fazerem parte do meu desenvolvimento acadêmico.

À Dra. Maria de Lurdes por ter aceitado me orientar, pela oportunidade de realizar o mestrado.

À minha orientadora Dra. Patrícia Gôlo, por ter seguido minha orientação, pelo auxílio, pela aprendizagem e pela parceria. Foram fundamentais para minha formação. Muito obrigada por tudo!

À minha coorientadora Dra. Clélia. Muito obrigada por esses seis anos de parceria. Obrigada por ter dividido seu conhecimento, pela sua confiança, seu tempo, auxílio e compreensão. Sou muito grata por tudo!

Ao CNPq, a FAPERJ, a UFRRJ e Instituto Oswaldo Cruz pelo auxílio financeiro prestado.

Obrigado a todos que contribuíram de alguma forma com este trabalho!

BIOGRAFIA

GABRIELA FRIANI VIEIRA TREVISANO, filha de José Luiz Vieira da Silva e Dirce Friani da Silva, nascida em 9 de agosto de 1989, na cidade de Colatina, Espírito Santo.

Iniciou o curso de Ciências Biológicas na Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Faculdade de Formação de Professores (FFP) em agosto de 2008, concluindo-o em agosto 2014.

Foi monitora da disciplina de Introdução ao Pensamento Biológico na UERJ, no ano de 2009, sendo bolsista da própria Universidade.

Estagiou e foi bolsista de Iniciação Científica pelo Centro de Integração Empresa Escola (CIEE) no Laboratório de Esquistossomose Experimental/IOC/Fiocruz, no período de 2010 a 2012.

Ingressou no curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), em março 2015, onde foi bolsista do CNPq até fevereiro de 2016. Foi contemplada com a Bolsa Nota 10 da FAPERJ durante 12 meses.

Em dezembro de 2016 foi aprovada no processo de seleção ao nível de doutorado no curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

RESUMO

TREVISANO, Gabriela Friani Vieira. **Alterações imunológicas e histopatológicas em *Biomphalaria glabrata* SAY, 1818 (PULMONATA: PLANORBIDAE) infectada por *Schistosoma mansoni* SAMBON, 1907 (TREMATODA: SCHISTOSOMATIDAE) e exposta a concentração subletal do látex de *Euphorbia milii* (syn *splendens*) var. *hislopii* (Euphorbiaceae).** 2017. 45p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

No Brasil a esquistossomose mansônica acomete cerca de sete milhões de pessoas e 25 milhões estão sob risco contrair a doença. Uma das medidas de controle da esquistossomose é o uso de moluscidas, dentre os naturais testados, o látex de *Euphorbia milii* var. *hislopii* apresentou-se como potencial moluscida em baixas concentrações, enquadrando-se nos critérios da OMS. Este trabalho tem por objetivo verificar as alterações imunológicas e teciduais provocadas pela exposição à concentração subletal do látex de *E. milii* por 24 horas em *Biomphalaria glabrata* infectada por *Schistosoma mansoni*. As análises foram feitas em quatro grupos de moluscos: infectado por *S. mansoni* e exposto ao látex (IE), não infectado e exposto ao látex (E), apenas infectado (I) e controle - sem infecção e exposição (C). As alterações imunológicas foram analisadas individualmente em 10 moluscos de cada grupo, através da quantificação e tipagem de hemócitos e produção de óxido nítrico. Em relação à histologia, cinco moluscos de cada grupo foram separados para a análise, através de cortes longitudinais. Os resultados relacionados a contagem de hemócitos foram: o grupo I apresentou menor quantidade de hemócitos, e o grupo IE a maior. Os grupos E e C não apresentaram diferença significativa. Foram encontrados três tipos de hemócitos: hialinócitos, granulócitos e células blásticas. Em todos os grupos a proporção hialinócitos foi superior, C (59,8%), E (47,5%), I (45,7%), IE (41,3%). Nos grupos E (28,4%), I (36,8%) e IE (31,7%) o segundo maior tipo de hemócitos foi granulócitos, seguido por células blásticas em menor proporção. No grupo C as células blásticas representaram 27,5%, seguido dos granulócitos 12,5%. Não houve diferença significativa entre os tipos celulares e os diferentes grupos analisados em 24 horas. Comparando os tipos de hemócitos em cada grupo, observamos diferença significativa entre o número de células do tipo hialinócitos e blásticas tanto nos grupos controle, como dos infectados. Com relação a produção de óxido nítrico (NO), os moluscos do grupo C apresentaram uma quantidade superior comparado aos demais. Não houve diferença na produção NO comparando o grupo IE, com os grupos E e I. O grupo E apresentou uma redução em comparação com o grupo I. A exposição ao látex promoveu no grupo IE, intensa proliferação de hemócitos no tentáculo, manto, mufla, glândula digestiva, rim e ovotestes. Na glândula digestiva e no rim foram observadas reações granulomatosas em torno dos esporocistos, característica de moluscos refratários à infecção. No manto, foi observado destruição tecidual com esporocistos mortos. No grupo E também houve proliferação hemocitária no rim e na glândula digestiva, além de edemas na região do manto. Conclui-se que a concentração subletal do látex de *E. milii* influenciou a resposta imune celular de uma linhagem suscetível de *B. glabrata* a infecção por *S. mansoni*, levando a destruição dos parasitos no tecido como observado em linhagens de moluscos resistentes a infecção.

Palavras-chave: *Biomphalaria glabrata*, *Euphorbia milii*, hemócitos.

ABSTRACT

TREVISANO, Gabriela Friani Vieira. **Immunological and histopathological changes in *Biomphalaria glabrata* SAY, 1818 (PULMONATA: PLANORBIDAE) infected by *Schistosoma mansoni* SAMBON, 1907 (TREMATODA: SCHISTOSOMATIDAE) and exposed to the sublethal concentration of latex of *Euphorbia milii* (syn *splendens*) var. *hislopii* (Euphorbiaceae).** 2017. 45p. Dissertation (Master in Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

In Brazil, schistosomiasis mansoni affects about 7 million people and other 25 millions are at the risk contracting a disease. One of the ways to control schistosomiasis is the use of molluscicides to control the intermediate host. Among the non-chemicals tested, latex *Euphorbia milii* var. *hislopii* showed molluscicide potencial in low concentrations following the criteria of WHO. This thesis aimed to verify *Biomphalaria glabrata* immunological and tissue changes caused by exposure to a sublethal concentration of *E. milii* latex for 24 hours. The analysis were made in 4 groups of mollusks : infected by *S. mansoni* and exposed to latex (IE) uninfected and exposed to latex (E), only infected (I) and control – neither infected nor exposed (C). The immunological analysis was made in 10 mollusks of each group through the quantification, chracterization of hemocytes and production of nitric oxide. In relation to histology, five mollusks of each group were separated to the analysis, through longitudinal sections. The results related to the number of hemocytes were: group I presented the lower number of hemocytes than others and group IE showed the significative increase comparing with the others. The groups E and C did not present significative difference. Three types of hemocytes were found: hyalinocytes, granulocytes and blast-like cells. In all the groups the proportion of hyalinocytes was superior, C (59,8%), E (47,5%), I (45,7%), IE (41,3%). In groups E (28,4%), I (36,8%) and IE (31,7%) the second greatest type was granulocytes followed by blast-like cells in lower proportion. In group C the blast-like cells represented 27,5%, followed by granulocytes 12,5%. There was no significant difference among the cell types and the different groups analyzed in 24 hours. Comparing the types of hemocytes in each group significant difference was observed between the number of cells of the type hyalinocytes and blast-like in the control and infected group. Concerning the NO production, the mollusks of group C showed an increase comparing with the others. There was no difference in the NO production comparing the group IE with the groups E and I. Whereas the group E presented a reduction in relation to the group I. The *E.milii* latex exposition promoted, in the group infected by *S. mansoni* a great proliferation of hemocytes in the tentacles, mantle, mufla, digestive gland, kidney and ovotestis. In the digestive gland and the kidney were observed granulomatous reactions around the sporocysts, characteristics of mollusks resistant to the infection. In the mantle, tissue destruction with dead sporocysts was observed. In the uninfected group and exposed, there was also proliferation of hemocytes in the kidney and the digestive gland, besides of this we observed edema in the mantle area. We conclude that the sublethal concentration of the latex of *E. milii* influenced the immune response of the suscetible lineage *B. glabrata* to infection by *S.mansoni*, promoting the destruction of parasites as observed in resistant snails.

Key words: *Biomphalaria glabrata*, *Euphorbia milii*, haemocytes.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Exemplar de *Biomphalaria glabrata* (Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental (LAPSA)/Instituto Oswaldo Cruz (IOC)/Fundação e Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)).4
- Figura 2 – *Biomphalaria* sp.: parcialmente dissecada: órgãos hermafroditas, órgãos femininos, órgãos masculinos. Gânglios nervosos (sn), glândula salivar (gs), glândula de albúmen (ga), veia pulmonar (vp), veia renal (vr), tubo renal (tr), crista renal (cr), pericárdio (pc), colar ou borda do manto (cm), ureter (ur), meato do ureter (mu), cavidade pulmonar (cp), saco bucal (sb), esôfago (ef), estômago (est), intestino (i) e glândula digestiva (gd). Estruturas hermafroditas: canal coletor do ovoteste (cc), vesícula seminal (vs), ovispermiduto (od) e ovoteste (ot); estruturas masculinas: bainha do pênis (bp), canal deferente (cd), próstata (pr), prepúcio (pp) e espermiduto (ed); estruturas femininas: bolsa do oviduto (bo), espermateca (es), canal da espermateca (ces), glândula nidamental (gn), oviduto (ov), vagina (va), bolsa vaginal (bv) e útero (ut).5
- Figura 3 - Microscopia de luz e microscopia de contraste de interferência diferencial de hemócitos de *Biomphalaria glabrata*. A: Célula blástica, N = núcleo grande e central; B: Granulócito, as setas indicam os grânulos; C: Hialinócito, as setas representam pseudópodes. Barras = 10 µm.9
- Figura 4 – A: Microisoladores contendo *Mus musculus* (linhagem Swiss) infectados por *Schistosoma mansoni* no biotério do Pavilhão Lauro Travassos/Fiocruz. B: Exemplares de *Biomphalaria glabrata* durante o processo de infecção por *Schistosoma mansoni*. C: Exemplares de *Biomphalaria glabrata* expostos à luz para eliminação de cercárias. D: Exemplar *Mus musculus* (linhagem Swiss) durante o processo de infecção *Schistosoma mansoni*.16
- Figura 5 – A: *Euphorbia milii* var. *hislopii* (syn. *splendens*) (Des Moulins, 1826). B: Solução estoque látex de *Euphorbia milii*. C: Exemplar de *Biomphalaria glabrata* expostos ao látex de *Euphorbia milii*.18
- Figura 6: Efeitos da exposição a concentração subletal do látex de *Euphorbia milii* na sobrevivência de *Biomphalaria glabrata* não infectados e infectados por *Schistosoma mansoni*. (*) diferença significativa entre os grupos nas diferentes concentrações.....22
- Figura 7: Efeitos da exposição ao látex de *Euphorbia milii* no número de hemócitos circulantes na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* não infectados e infectados por *Schistosoma mansoni*.....23
- Figura 8: Tipos de hemócitos presente na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata*. A: Célula blástica indicada pela seta. B: Hialinócitos indicados pelas setas. C: Granulócitos indicados pelas setas.24

Figura 9: Concentração de nitrito/nitrato (μM) na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* infectado e não infectados em função da exposição a concentração 1,0 mg/L do látex de *Euphorbia milii*. (a, b, c) Letras diferentes demonstram diferença significativa entre os grupos..... 25

Figura 10 - A: *Biomphalaria glabrata* Grupo Controle não infectado região glândula digestiva sem alterações; B: Grupo não infectado exposto ao látex de *Euphorbia milii* região do rim, com discreta presença de hemócitos (seta). C: Grupo não infectado exposto ao látex de *Euphorbia milii* região da glândula digestiva, com mais hemócitos presentes no tecido (seta). D: Grupo não infectado exposto ao látex de *E. milii* região do manto, com edemas (*) e poucos hemócitos pelo tecido (seta).27

Figura 11 - A: *Biomphalaria glabrata* Grupo Controle infectado por *Schistosoma mansoni* região do rim e manto, com presença de esporocistos (*) e hemócitos teciduais (setas); B: Grupo infectado exposto ao látex de *Euphorbia milii* região do rim, apresenta denso infiltrado de hemócitos (setas) e reação do tipo granulomatosa (círculos), ambos em torno dos esporocistos. C: Grupo infectado exposto ao látex de *Euphorbia milii* região da glândula digestiva, com mesmos resultados do rim. D: Grupo infectado exposto ao látex de *Euphorbia milii* região do manto, com acúmulo de hemócitos, destruição do tecido e dos parasitos (circulo). E: Grupo infectado exposto ao látex de *Euphorbia milii* região ovoteste, apresentou presença de hemócitos (setas).....28

LISTA DE TABELA

Tabela 1– Quantificação do tipo hemócitos presentes na hemolinfa <i>Biomphalaria glabrata</i> não infectada e infectada por <i>S. mansoni</i> avaliando os efeitos da exposição do látex <i>Euphorbia milii</i>	24
---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 <i>Biomphalaria</i> spp.	3
2.2 Relação <i>Schistosoma mansoni</i> e <i>Biomphalaria</i> spp.	6
2.3 Sistema Imune dos Moluscos	7
2.4 Moluscicidas: Uma das Medidas para o Controle da Transmissão da Esquistossomose	12
3 MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 Nota Ética	15
3.2 Obtenção do Parasito e Infecção Experimental	15
3.2.1 Manutenção do ciclo <i>Schistosoma mansoni</i> em laboratório	15
3.3 Obtenção do Látex de <i>Euphorbia milii</i>	17
3.4 Delineamento Experimental	19
3.4.1 Sobrevivência de <i>Biomphalaria glabrata</i> exposta ao látex de <i>Euphorbia milii</i>	19
3.4.2 Obtenção da hemolinfa de <i>Biomphalaria glabrata</i>	19
3.4.3 Contagem de hemócitos	19
3.4.4 Caracterização dos hemócitos	19
3.4.5 Dosagem de óxido nítrico	20
3.4.6 Análise histopatológica	20
3.5 Análise Estatística	21
4 RESULTADOS	22
4.1 Sobrevivência de <i>Biomphalaria glabrata</i> exposta a concentração subletal do látex de <i>Euphorbia milii</i>	22
4.2 Contagem de Hemócitos	23
4.3 Caracterização dos Hemócitos	24
4.4 Dosagem de Óxido Nítrico	25
4.5 Análise Histopatológica	26
5 DISCUSSÃO	29
6 CONCLUSÕES	32
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose é considerada uma doença tropical negligenciada (DTN), afeta mais de 230 milhões de pessoas em todo o mundo, não sendo atrativa a grandes investimentos de indústrias farmacêuticas e de biotecnologia (ROFFATO *et al.*, 2011). A contaminação é complexa devido aos diversos fatores envolvidos como: presença do hospedeiro intermediário (caramujos do gênero *Biomphalaria* spp. infectados pelo *Schistosoma mansoni*); presença do hospedeiro definitivo (homem e outros mamíferos); condições socioeconômicas e culturais; modo de vida (ocupação e lazer); escassez de saneamento básico e de projetos eficientes de educação em saúde para a população exposta ao risco (BRASIL, 2011).

É estimada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), desde 1997, como a segunda doença parasitária mais prevalente no mundo, ficando atrás apenas da malária. Segundo o índice DALY (Disability-Adjusted Life Years), anos de vida perdidos ajustados por incapacidade, o impacto global da esquistossomose é de 5,8 milhões de anos de vida perdidos.

A esquistossomose é uma parasitose encontrada em 54 países da África, Ásia e das Américas. Na América Latina é presente na Venezuela, nas ilhas do Caribe, Suriname e no Brasil. O último é o país com maior área endêmica das Américas com 19 estados incidentes. Estima-se que sete milhões de pessoas estejam infectadas e 25 milhões correm o risco de adquirir a doença. Os estados de maior incidência são: Alagoas, Maranhão, Bahia, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Paraíba, Sergipe, Espírito Santo e Minas Gerais. No Pará, Piauí, Ceará, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás e no Distrito Federal, a transmissão é focal (KATZ & PEIXOTO, 2000; BRASIL, 2014). Esta doença apresenta importância médica e veterinária, visto que há casos de infecção e manutenção do ciclo em roedores silvestres (*Holochilus brasiliensis* e *Nectomys squamipes*) e de produção, como os bovinos.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) apresenta um plano estratégico com três metas com previsões para até 2025: 1- Controle da morbidade causada pela esquistossomose (até 2020), 2- eliminação da doença como um problema de saúde pública e 3- interrupção da transmissão. Desde 2001, o Brasil participa da Resolução WHA65-21, da OMS que se propõe eliminar a transmissão da esquistossomose no mundo. O objetivo principal do projeto no Brasil é eliminar a doença como problema de saúde pública nas áreas endêmicas e reduzir o percentual de positividade para menos de 5%. Já nas áreas de baixa endemicidade, o objetivo é interromper a transmissão.

Para tal algumas medidas são propostas como: diagnóstico, tratamento dos indivíduos infectados, ações educativas para a população exposta ao risco, obras de engenharia de saúde pública, intervenções no meio ambiente para interromper o ciclo de transmissão, com uso de moluscicida ou controle biológico. Sendo que a aplicação de métodos químicos no controle dos moluscos é recomendada como medida auxiliar nos locais em que os focos apresentam importância epidemiológica e quando as obras de engenharia sanitária não são viáveis.

O uso de moluscicidas é uma das medidas interventivas preconizadas para o controle da esquistossomose ou produtos que possam reduzir a transmissão do ciclo veiculado na água. Produtos de origem sintética, como a Niclosamida, nome comercial Bayluscide®, são utilizados, porém essa substância ocasiona danos em organismos não alvos da flora e da fauna, genotoxicidade e efeitos carcinogênicos, além do custo alto.

Por conta disto, os moluscicidas de origem vegetal, como o látex de *Euphorbia milii* var. *hislopii*, surgiram como uma alternativa biodegradável, de baixo custo e menos agressiva ao ambiente e a outros organismos não alvos. Além disso, o látex de *E. milii* se enquadra nos critérios estabelecidos pela OMS, para ser usado como moluscicidas em programas de controle da esquistossomose. Torna-se fundamental estudos para o conhecimento do impacto da aplicação deste produto no recurso hídrico e de sua ação na relação parasito/ hospedeiro e ambiente, para que a aplicação do moluscicida tenha o máximo de eficácia e o menor dano ao ambiente.

Este trabalho teve por objetivo investigar possíveis alterações imunológicas e histopatológicas em *B. glabrata* infectada por *S. mansoni* e exposta à concentração subletal do látex de *E. milii* var. *hislopii*. Sendo realizado através da quantificação e caracterização de hemócitos, dosagem de óxido nítrico na hemolinfa e análise histopatológica do tecido de *B. glabrata* não infectada e infectada por *S. mansoni* e exposta ao látex. Com intuito de complementar os estudos no auxílio ao controle da transmissão da esquistossomose mansônica no Brasil.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Biomphalaria* spp.

Os hospedeiros intermediários da esquistossomose no Brasil estão inseridos taxonomicamente no filo Mollusca, classe Gastropoda, subclasse Pulmonata, ordem Basommatophora, família Planorbidae e gênero *Biomphalaria*. Deste gênero três espécies são encontradas infectadas naturalmente por *Schistosoma mansoni*: *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), *Biomphalaria tenagophila* (D'orbigny, 1835) e *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848). As espécies *Biomphalaria peregrina* (D'orbigny, 1835), *Biomphalaria amazonica* (Paraense, 1966) e *Biomphalaria cousini* (Paraense, 1966), são consideradas hospedeiras em potencial deste helminto, pois foram infectadas experimentalmente (PARAENSE, 2011).

A espécie *B. glabrata* é considerada a hospedeira intermediária de *S. mansoni* de maior importância nas Américas, pois apresenta altos níveis de infecção, capacidade de adaptação às diferentes condições ambientais, sobrevivendo à secas periódicas e resistindo a dissecação, além de ampla distribuição geográfica, associada geralmente a presença da esquistossomose. Podem colonizar grande diversidade de ambientes límnicos, água parada ou com pouca correnteza (SOUZA & LIMA, 1990; CARVALHO *et al.*, 2007).

Os moluscos do gênero *Biomphalaria* apresentam concha planispiral, com seis a sete giros, como no caso da espécie *B. glabrata* que é a maior da família chegando a medir 40 mm (Figura 1). São hermafroditas, como todos os planorbídeos, realizam fecundação cruzada ou auto-fecundação, sendo a primeira preferencial. O sistema genital destes organismos é formado pelo ovoteste, órgão que produz células germinativas femininas e masculinas (Figura 2). Ele é composto de vesículas, onde se desenvolvem as células reprodutoras femininas e masculinas, que são lançadas no canal coletor que se estreita constituindo o ovispermiduto, emissor de divertículos, que formam as vesículas seminais (onde acumulam e amadurecem os espermatozoides). Em seguida estreita-se e desemboca em uma pequena bolsa (encruzilhada genital), onde o sistema é dividido em dois ramos, o feminino (composto pela glândula de albúmen, oviduto, glândula nidamental, útero, vagina e espermateca) e o masculino (espermiduto, próstata, canal deferente e complexo peniano) (PARAENSE, 2008).



Figura 1 – Exemplar de *Biomphalaria glabrata* (Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental (LAPSA)/Instituto Oswaldo Cruz (IOC)/Fundação e Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)).
Fonte: Elaborada pela autora.

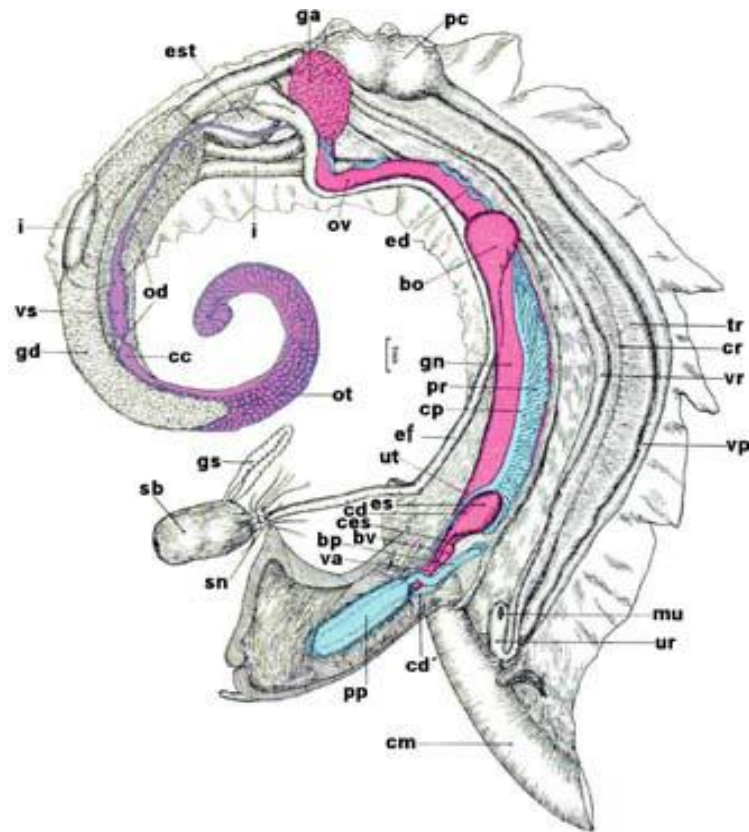


Figura 2 – *Biomphalaria* sp.: parcialmente dissecada: órgãos hermafroditas, órgãos femininos, órgãos masculinos. Gânglios nervosos (sn), glândula salivar (gs), glândula de albúmen (ga), veia pulmonar (vp), veia renal (vr), tubo renal (tr), crista renal (cr), pericárdio (pc), colar ou borda do manto (cm), ureter (ur), meato do ureter (mu), cavidade pulmonar (cp), saco bucal (sb), esôfago (ef), estômago (est), intestino (i) e glândula digestiva (gd). Estruturas hermafroditas: canal coletor do ovoteste (cc), vesícula seminal (vs), ovispermiduto (od) e ovoteste (ot); estruturas masculinas: bainha do pênis (bp), canal deferente (cd), próstata (pr), prepúcio (pp) e espermiduto (ed); estruturas femininas: bolsa do oviduto (bo), espermateca (es), canal da espermateca (ces), glândula nidamental (gn), oviduto (ov), vagina (va), bolsa vaginal (bv) e útero (ut) (PARAENSE & DESLANDES, 1955. In: THIENGO & FERNANDEZ, 2008).

Para diferenciar as espécies do gênero *Biomphalaria* são levadas em consideração as seguintes características: tamanho e tipo de abertura da concha, presença ou ausência de carena, número de divertículos no ovoteste, presença ou ausência de crista renal no tubo renal, vesícula seminal ou próstata, caracteres da parede vaginal (expandida em bolsa ou não; ausência ou presença de enrugamento), relação do tamanho do pênis com o prepúcio e entre o diâmetro da bainha do pênis e o canal deferente (PARAENSE, 1975; 2008).

Os moluscos planorbídeos possuem sistemas respiratório, circulatório, digestório e nervoso. A respiração se dá através do saco pulmonar virtual, sendo a troca gasosa realizada pelo tecido conjuntivo frouxo. Enquanto que, a respiração aquática é feita pela pseudobrânquia. O sistema nervoso é composto por um conjunto de gânglios e conexões nervosas, localizados atrás do saco bucal (SANTHANAGOPALAN & YOSHINO, 2000). O sistema digestório é completo, iniciando-se na cavidade bucal, esôfago, que se apresenta como um canal condutor do alimento para o estômago. O estômago se comunica com a glândula digestiva, principal órgão do sistema digestório dos moluscos encarregado da absorção e do acúmulo de reservas de energia, sob a forma de glicogênio. Os resíduos sólidos da digestão são levados para o intestino e eliminados para o meio externo (PARAENSE, 2001).

Apresentam hemolinfa vermelha, rica em hemoglobina. A circulação hemolinfática é realizada através do bombeamento do coração, formada por um átrio e um ventrículo. A hemolinfa rica em hemoglobina oxigenada chega ao coração através da veia pulmonar e sai pela aorta, que a distribui para todo o corpo. O soro passa pelo canal renopericárdio, a fim de ser filtrado pelo rim. Depois de absorvidos os elementos orgânicos necessários, o restante do soro desce para o terço final do manto, transformando-se em urina, que é eliminada pelo meato do ureter (PARAENSE, 1975).

2.2 Relação *Schistosoma mansoni* e *Biomphalaria* spp.

O *S. mansoni* é um helminto pertencente ao filo Platyhelminthes, classe Trematoda, subclasse Digenea, família Schistosomatidae, gênero *Schistosoma*. Ele apresenta ciclo de vida complexo, tem como hospedeiro intermediário moluscos do gênero *Biomphalaria*. Para que o parasito se desenvolva com sucesso no hospedeiro intermediário dependerá de alguns fatores como: encontrar e penetrar em hospedeiros compatíveis, adaptar-se as condições de estresse relacionados a variações da fisiologia dos moluscos (osmolaridade, pH, concentração de oxigênio e de gás carbônico e concentração de glicose); obter nutrientes adequados para o seu crescimento e reprodução; escapar dos mecanismos de destruição do sistema de defesa dos hospedeiros (NEGRÃO-CORRÊA *et al.*, 2008).

A infecção se dá por meio da penetração ativa das larvas ciliadas de *S. mansoni*, os miracídios, em qualquer parte mole de *Biomphalaria* spp. (geralmente base dos tentáculos e massa cefalopediosa). O miracídio atravessa o epitélio do hospedeiro, no processo de penetração sofre mudanças morfofisiológicas transformando-se em esporocisto primário e este permanecerá no tecido fibromuscular próximo ao local de penetração. Do 14^o ao 21^o dias originam os esporocistos secundários, que migram para a glândula digestiva do molusco. Neste órgão os esporocistos sofrem modificações e suas células germinativas se transformam em cercárias (PEREIRA *et al.*, 1984). No caso de *S. mansoni*, a fase sexuada pode ocorrer em algumas espécies de mamíferos, inclusive o homem, que é seu principal hospedeiro definitivo, enquanto que a fase de evolução de esporocisto para cercária, fase assexuada de reprodução, restringe a poucas espécies de *Biomphalaria* spp.

Aproximadamente após três semanas de infecção as cercárias saem pelo tegumento do molusco e entram em contato com o ambiente límnico. Diversos estímulos ambientais (como temperatura, luminosidade) e sinais químicos (L-arginina da epiderme do hospedeiro definitivo) estimulam a natação das cercárias, direcionando-as para próximo do hospedeiro. Ao penetrar no corpo do hospedeiro mamífero ocorrem intensas modificações ultraestruturais e fisiológicas no parasito, as cercárias se transformam em esquistossômulos. Que se deslocam em direção a derme e saem por via sanguínea ou linfática. Ao saírem da pele passam pela pequena circulação, chegam aos pulmões e posteriormente ao fígado. Local onde amadurecem e acasalam, após migram em direção aos vasos mesentéricos para a postura dos ovos. Estes atravessam a mucosa intestinal e posteriormente são liberados junto com as fezes. Eles contêm internamente o miracídio que no meio aquático eclode, nadam à procura do hospedeiro intermediário, fechando assim o ciclo (LENZI *et al.*, 2008).

A compatibilidade entre *S. mansoni* e seu hospedeiro intermediário é influenciada por fatores comportamentais e fisiológicos do molusco. O nível de susceptibilidade de *Biomphalaria* a linhagem de *S. mansoni* pode ser determinado por diferenças genéticas (BASCH, 1976). Segundo Newton (1952) a susceptibilidade de *B. glabrata* a *S. mansoni* está associada ao caráter hereditário, que provavelmente está atrelado a fatores genéticos. Dentre as três espécies hospedeiras de *S. mansoni* no Brasil, *B. glabrata* é considerada a mais susceptível e a *B. straminea* é identificada como a mais resistente, apesar de haver diferenças entre as linhagens dos diferentes locais (FERNANDEZ & THIENGO, 2002).

Outro fator que influencia a susceptibilidade é a atividade do sistema imune dos caramujos. Visto que, a sobrevivência do parasito no interior do hospedeiro durante a infecção pode ser definida pela composição celular da hemolinfa e a capacidade de ativação destas células (NEGRÃO-CORRÊA *et al.*, 2008).

2.3 Sistema Imune dos Moluscos

Os moluscos, assim como invertebrados não possuem resposta imune adquirida capaz de realizar seleção clonal e produzir anticorpos, entretanto o sistema imune desses invertebrados é capaz de remover de forma rápida e eficaz qualquer corpo estranho presente dentro do seu organismo (COUSTAU & YOSHINO, 1998). Parte dos fenômenos imunológicos está atribuída à imunidade celular associada a células denominadas hemócitos presentes na hemolinfa (FRIED, 2016).

O sistema interno de defesa (SID) dos invertebrados é capaz de reconhecer e destruir agentes infecciosos. Hoffmann (2003) demonstrou muita similaridade entre a resposta de defesa inata de vertebrados e o sistema interna de defesa dos invertebrados. Nos caramujos a resposta inata é bem desenvolvida, subdividida em defesa humoral e celular. E o SID é composto pelos hemócitos, elementos celulares, e por fatores solúveis presentes na hemolinfa (BAKER, 1945; PARAENSE, 1970). Estas células são capazes de realizar o encapsulamento, fagocitose e liberação de substâncias citotóxicas, que são essenciais no processo de morte e eliminação dos patógenos invasores (BARRACCO, 1993).

Os hemócitos são análogos na sua forma e função aos macrófagos dos vertebrados, podem estar livres, circulantes na hemolinfa ou fixos nos tecidos (CAVALCANTI, 2011). O local de origem destas células ainda não foi estabelecido, alguns trabalhos sugerem a origem multicêntrica (WAGGE, 1955; CONNORS, 1995; SOUZA & ANDRADE, 2006), enquanto que outros acreditam que uma estrutura localizada na região renopericárdia, o órgão produtor de amebócitos (APO), seja o sítio de origem dos hemócitos (LIE & HEYNEMAN, 1975; LIE

et al., 1975; CHENG, 1977). Souza & Andrade (2012) apontam que essas células são formadas em locais diferentes nos caramujos, como dentro do tecido conectivo e sistema vascular ou no APO, localizado perto do rim, entre o pericárdio e o epitélio posterior do manto.

A hipótese de existência de várias subpopulações de hemócitos circulantes na hemolinfa de Gastropoda tem sido muito aceita. Inicialmente as classificações dessas células em *Biomphalaria* eram baseadas na aderência destas aos diferentes substratos (JOHNSTON & YOSHINO, 2001). Hoje outros critérios são levados em consideração para classificar os tipos hemócitos como granularidade, tamanho da célula, marcadores bioquímicos e de superfície celular, características ultra-estruturais, morfologia, caracterização do núcleo, dentre outros (MARTINS-SOUZA *et al.*, 2006; 2009; CAVALCANTI *et al.*, 2012).

Cheng (1975) e Yoshino (1976) identificaram a existência de dois tipos celulares, granulócitos e hialinócitos. A maioria dos autores também distingue em duas subpopulações de hemócitos circulantes (LIE *et al.*, 1987; BARROCO *et al.*, 1993; BORGES & ANDRADE, 2003). Os granulócitos como sendo células que medem 7 a 11 μm de diâmetro, núcleo excêntrico, esférico ou reniforme, nucléolo proeminente. O citoplasma granular, protegido por uma membrana bem definida, rico em organelas. Estas células emitem numerosos prolongamentos citoplasmáticos, delgados e longos (filopódios). São funcionalmente semelhantes aos macrófagos de mamíferos (BAYNE *et al.*, 1980). Os hialinócitos são geralmente menores, medindo 4 a 8 μm de diâmetro, citoplasma contendo raras organelas, não apresentam grânulos e ausência de pseudópodes extensos (BARROCO *et al.*, 1993).

Outros autores como Matricón-Gondran & Letorcart (1999) identificaram três subpopulações de hemócitos presentes na hemolinfa de *B. glabrata*: hemócitos grandes, hemócitos de tamanho médio e os pequenos hemócitos. Essa classificação foi baseada no tamanho das células e nas características ultraestruturais.

Um estudo mais recente indica a existência de outros subtipos de hemócitos. Cavalcanti *et al.* (2012) propôs cinco subtipos de hemócitos presentes na hemolinfa de *B. glabrata*: células blásticas (Figura 3A), granulócitos (Figura 3B) e hialinócitos (Figura 3C) de três tipos I, II e III. As células blásticas apresentam núcleo grande que ocupa quase toda a célula, com características de células jovens ou de células precursoras de outros hemócitos, 4-5 μm de tamanho. Os granulócitos medem 7-8 μm , são células polimórficas, varia de esférico a fusiforme, preenchidos com grânulos basófilos. Já os hialinócitos do tipo I são células, polimórficas, núcleo central, 7-12 μm de tamanho. Os de tipo II variam 9-10 μm de diâmetro, formato oval, núcleo excêntrico. E os hialinócitos tipo III é o maior tipo de hemócito, que varia de 10-12 μm , formato esférico a oval, núcleo grande e esférico.

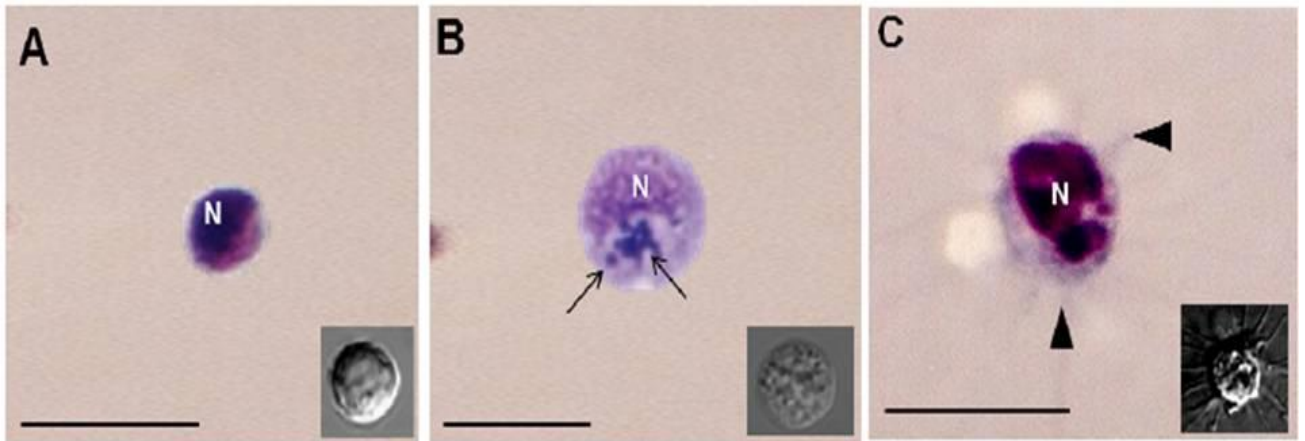


Figura 3 – Microscopia de luz e microscopia de contraste de interferência diferencial de hemócitos de *Biomphalaria glabrata*. A: Célula blástica, N = núcleo grande e central; B: Granulócito, as setas indicam os grânulos; C: Hialinócito, as setas representam pseudópodes. Barras = 10 μ m (CAVALCANTI, 2011).

A resposta humoral em *Biomphalaria* não é muito bem esclarecida. O mecanismo de defesa humoral nos moluscos inclui a presença e a ação de enzimas, aglutininas, fatores antimicrobianos e substâncias com ação semelhante às linfocinas (ZELCK *et al.*, 1995). Os componentes de resposta humoral são capazes de modular a atividade dos hemócitos (CONNORS *et al.*, 1995).

Os fatores envolvidos na resposta humoral podem ocasionar lise na célula alvo além de desempenhar vários papéis na defesa interna do molusco (LEIPPE & RENWRANTZ, 1988). As substâncias presentes na hemolinfa de *B. glabrata* são capazes de promover a aglutinação de hemócitos em torno dos esporocistos de *S. mansoni* (LOKER *et al.*, 1984). Fryer & Bayne (1996) sugerem que fatores humorais participam no mecanismo de reconhecimento e opsonização das partículas, o que pode favorecer o processo de fagocitose em *B. glabrata*.

Segundo Richard & Renwrantz (1991), as lectinas de moluscos são sintetizadas pelos hemócitos e podem ser liberadas na hemolinfa ou serem expressas na superfície das células circulantes onde carboidratos são capazes de agir como receptores. Estas substâncias com capacidade aglutinante podem auxiliar a elucidar a relação caramujo-parasito, sendo sua atividade evidente em linhagens resistentes ao *S. mansoni*, e ausente em *B. glabrata* suscetível (FRYER *et al.*, 1989). Sendo assim, a destruição do esporocisto de *S. mansoni* em *B. glabrata* através da resposta imune humoral é tão importante quanto a celular (GRANATH & YOSHINO, 1984).

Com relação à resposta celular nos moluscos, os hemócitos são os principais mediadores do sistema. Apresentam variadas funções como fagocitose de partículas, microorganismos ou encapsulando grandes invasores, como é o caso das larvas de helmintos (ADEMA *et al.*, 1997). Realizam processo de pinocitose, formação de granulomas, coagulação da hemolinfa e cicatrização (WAGGE, 1955). Além disso, são responsáveis pelo transporte de cálcio, visando o reparo do tecido (RATCLIFFE, 1985) e de produzir carboidratos, proteínas e peptídeos que atuam na resposta humoral.

Aspectos histopatológicos são diferentes em moluscos suscetíveis e resistentes a infecção. Em moluscos suscetíveis há a presença de um grande número de parasitas resultando na dissociação e compressão de estrutura do hospedeiro, principalmente nas glândulas digestivas, ovoteste e túbulos renais. Enquanto que em caramujos resistentes aparecem extenso infiltrado de hemócitos, em torno de esporocistos em desintegração, podendo apresentar lesão encapsulante, o granuloma. Esta lesão é formada pela disposição concêntrica dos hemócitos em torno de parasitos que podem ser estar degradados (NEGRÃO-CORRÊA *et al.*, 2008).

Acreditava-se que os invertebrados desenvolviam resposta inata limitada no reconhecimento de patógenos. Hoje já se sabe que alguns invertebrados apresentam proteínas capazes de reconhecer diferentes patógenos, ou seja, de diferenciar o próprio do não próprio, o que contribui para uma resposta imune mais apropriada (NEGRÃO-CORRÊA *et al.*, 2008).

O processo de sinalização celular em invertebrados é pouco conhecido. A transdução de sinais em gastrópodes envolve várias proteínas celulares e receptores presentes em hemócitos (TIERNEY, 2001). Os receptores podem ser agrupados em categorias: lectinas, integrinas e fatores de crescimento (TORGERSEN *et al.*, 2002). Muitos receptores celulares que quando ativados desencadeiam processo de opsonização, fagocitose, processo inflamatório, apoptose entre outros (VALANNE *et al.*, 2011).

Em invertebrados o processo de fagocitose é uma resposta de defesa celular primária. Este processo de defesa ocorre contra materiais inertes ou organismos com vírus, bactérias, protozoários, fungo e até mesmo helmintos (LAVINE & STRAND, 2002). Os hemócitos contêm estruturas que se assemelham aos lisossomos, que se fundem com vesículas

endossômicas, onde ocorre a degradação do material fagocitado (VARGAS-ALBORES & BARRACO, 2001).

Os mediadores de provável reconhecimento de células fagocíticas são a interação lectina/carboidrato, já que os invertebrados não possuem anticorpos nem sistema complemento. Esse tipo de reconhecimento foi observado em *Biomphalaria glabrata* (MARTINS-SOUZA *et al.*, 2006). Ao longo do estímulo que leva a da fagocitose ocorre a ativação dos hemócitos, que se dá através de alterações da superfície celular, que se apresentam como extensão do citoesqueleto, extensão de pseudópodes e filópodes, alterações mitocondriais. Essa ativação celular ocorre rapidamente e dependerá do grau do estímulo (MATRICON-GONDRAN & LETOCART, 1999).

O processo de encapsulação acontece quando o corpo é muito grande para ser fagocitado, como é o caso das larvas de helmintos, ocorre uma aglomeração de hemócitos formando uma cápsula em torno do agente invasor e subsequentemente são lesados por metabólitos secretados pelos hemócitos (ADEMA *et al.*, 1997). Esse tipo de reação é comum em *B. glabrata*, encapsulam esporocistos de *S. mansoni* formando reação granulomatosa em torno dessas larvas (BORGES & ANDRADE, 2003).

Após a penetração de *S. mansoni* nos moluscos, ocorre imediatamente a encapsulação dos miracídios, que é determinante para sobrevivência ou morte do parasito no hospedeiro (LOKER *et al.*, 1982; VAN DER KNAAP & LOKER, 1990). Sendo que este processo pode ser modificado por vários fatores: nutrição do vetor, virulência da cepa do parasita, quantidade de hemócitos na hemolinfa, aspectos ambientais e número de miracídios que penetram no hospedeiro (BASCH, 1976). Segundo Bayne *et al.* (1984), os hemócitos de *B. glabrata* suscetíveis ou resistentes à infecção são capazes de encapsular os esporocistos de *S. mansoni*, mas só hemócitos de linhagens resistentes podem gerar danos à membrana dos esporocistos.

Outro mecanismo envolvido na destruição/morte do parasito é a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROS/RNS) pelos hemócitos. Essas células em gastrópodes produzem ROS, de forma semelhante à citotoxicidade oxidativa de macrófagos de mamíferos, em resposta à infecção por trematódeos (DIKKEBOOM *et al.*, 1988). Tal processo foi observado em hemócitos de *B. glabrata* quando infectada por *S. mansoni*, caso a produção de ROS pelos hemócitos seja inibida é possível verificar um comprometimento dos hemócitos em matarem o parasito (ADEMA *et al.*, 1994).

Uma dessas moléculas é o óxido nítrico (NO – nitric oxide), uma das mais simples e menores moléculas biossintetizadas (MORRIS & BILLIAR, 1994), sendo um radical livre, gasoso, inorgânico, incolor, que possui sete elétrons de nitrogênio e oito de oxigênio, tendo um elétron desemparelhado (BECKMAN & KOPPENOL, 1996). Ele é o principal mediador citotóxico de células imunes efectoras ativadas e uma das mais importantes moléculas reguladoras do sistema imune (HIBBS *et al.*, 1988).

O NO é produzido a partir da arginina por ação da enzima óxido nítrico sintetase (NOS - nitric oxide synthase). É considerado potencialmente tóxico, sendo a toxicidade presente em situações de estresse oxidativo, geração de intermediários do oxigênio e deficiência do sistema antioxidante (DUSSE *et al.*, 2003).

Muitos tipos de células fagocitárias de invertebrados possuem a óxido nítrico sintetase (NOS), que atua na produção de óxido nítrico (NO) a partir de oxigênio molecular e arginina. Um estudo sobre a morte de larvas de trematódeos por hemócitos de *B. glabrata*, verificou que a adição de L-NAME, inibidor da enzima NOS e com isso a produção de NO, foi capaz de inibir a mortalidade de esporocistos do trematódeo por hemócitos de *B. glabrata* resistente (HAHN *et al.*, 2000). Segundo Martins-Souza *et al.* (2006), os hemócitos de *Biomphalaria*

infectados ou não pelo *S. mansoni* podem produzir NO, na presença de antígenos solúveis de ovos (SEA) de *S. mansoni* ou de esporocistos transformados *in vitro*.

2.4 Moluscidas: Uma das Medidas para o Controle da Transmissão da Esquistossomose

Algumas atividades são propostas pelo Ministério da Saúde a fim de interromper a transmissão da esquistossomose como: diagnóstico, realizado através de exame coproparasitológico, sorológicos e outros disponíveis; tratamento dos indivíduos infectados com Oxaminiquine e/ou Praziquantel; intervenções no meio ambiente para interromper o ciclo de transmissão, com uso de moluscida ou controle biológico; além de educação para população sob o risco, obras de engenharia de Saúde Pública (construção de canais, drenagens, aterros, instalação da água encanada e obras de saneamento básico) (BRASIL, 2011; 2014).

O uso de moluscidas ou produtos veiculados na água que possam reduzir a transmissão do ciclo se enquadram como medida interventiva de controle da esquistossomose. No Brasil, os moluscidas começaram a ser empregados para controle desta doença em 1976, com a criação do Programa Especial para Controle da Esquistossomose (PECE) pela Fundação Nacional da Saúde (FNS) (MACHADO, 1982). Inicialmente foram usados produtos sintéticos, como a Niclosamida (Bayluscide®), porém apesar de sua eficácia como moluscida, essa substância pode ocasionar danos em organismos não alvos da flora e da fauna, genotoxicidade e efeitos carcinogênicos. Além do alto custo do produto, possibilidade de recolonização dos hospedeiros intermediários após a interrupção do tratamento, alta toxicidade e a resistência desenvolvida nos indivíduos do gênero *Biomphalaria*. São fatores limitantes para o uso constante em programas oficiais de controle em larga escala (MELLO-SILVA *et al.*, 2006; HAMED, 2010).

Devido essas questões, alguns compostos de origem vegetal têm sido testados como moluscidas naturais, levando em consideração os seguintes quesitos: serem biodegradáveis, mais baratos, não causarem danos a organismos não alvos e que tenham ação em baixas concentrações (MELLO-SILVA *et al.*, 2006; AUGUSTO *et al.*, 2012). Jurberg *et al.* (1989), fizeram levantamento de 340 espécies de plantas, e as que apresentaram maior potencial moluscida pertenciam a família Euphorbiaceae e Sapindaceae. A *Euphorbia milii* (*syn. splendens*) var. *hislopii* entre elas teve destaque por sua ação moluscida em concentrações menores que 0,5 mg/L, oito vezes menor do que a concentração para peixes (VASCONCELLOS & SCHALL, 1986).

E. milii é um arbusto, comumente chamado de coroa-de-cristo, originário de Madagascar (África) e apresenta de fácil cultivo (CORRÊA, 1984; SCHALL *et al.*, 2001). O látex desta planta é uma emulsão aquosa, composta por lípidios, resinas, açúcares, proteínas e enzimas (EL MOUSSAOUI *et al.*, 2001). A miliamina L é um dos componentes bioativos presentes no látex com maior eficiência, com letalidade de 90% quando usado em solução 0,001 ppm (ZANI *et al.*, 1993). O potencial desse componente é até 100 vezes mais ativo que Bayluscide®, nas doses indicadas para o controle de *B. glabrata* (ZANI *et al.*, 1989). Vasconcellos & Schall (1986) testaram a ação moluscida do látex de *E. milii* em *B. glabrata* e *B. tenagophila*, em concentrações menores que 0,5 ppm, obtiveram resultados promissores, o que possibilitou o depósito da patente de coleta, uso e armazenamento em 1990 no Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ/RJ).

A ação do látex do *E. milii* foi verificada em baixas concentrações para a espécie do gênero *Biomphalaria* e *Lymnaea*, em estudos laboratoriais e de campo, consolidando seu uso como possível moluscicida. Foram analisados a fotodegradabilidade, estabilidade (geográfica e anual), efeitos carcinogênico, mutagênico, embriotóxico, teratogênico e ecotoxicológico (SOUZA *et al.*, 1997; OLIVEIRA-FILHO *et al.*, 1999; VASCONCELLOS & AMORIN, 2003a; 2003b). Além disso, o látex de *E. milii* se enquadrar nos critérios estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para uso como moluscicida em programas de controle da esquistossomose (WHO, 2002).

Alguns trabalhos relatam alterações bioquímicas nos depósitos de carboidratos e proteínas, na biologia reprodutiva de *B. glabrata* infectada por *S. mansoni*, quando expostas ao látex *E. milii*. Verificaram que o látex provoca redução dos estoques glicídicos na massa cefalopodia e glândula digestiva, altera o perfil de excreção dos produtos nitrogenados, com aumento no nível de ureia e redução dos níveis de ácido úrico, além de redução significativa na atividade reprodutiva (MELLO-SILVA *et al.*, 2007; LIMA *et al.*, 2012; AUGUSTO *et al.*, 2015). Também foram realizados estudos comportamentais, demonstrando a biodegradação do produto nos moluscos também, sendo possível voltar aos padrões locomotores comportamentais após 30 dias de exposição ao produto (ALBERTO-SILVA, 2016).

Estudos relacionados à ação do látex de *E. milii* em massas ovíferas de *B. glabrata* e sobre as formas evolutivas, miracídios e cercárias de *S. mansoni*, identificaram uma dose letal muito maior do que a aplicada para os moluscos, faixa de 10-100 mg/L. Para os ovos do molusco, a concentração que o látex começa a ter efeito embriotóxico foi de 870 mg/L, sendo doses muito altas para serem aplicadas no ambiente (DE CARVALHO *et al.*, 1998; SCHALL *et al.*, 1998).

A ação do látex é similar entre os moluscos não infectados e infectados por *S. mansoni*, sendo que, quando estes animais encontra-se infectados os efeitos são mais acentuados e a mortalidade é maior. Configurando uma ação seletiva do látex de *E. milii*, onde os moluscos infectados são mais sensíveis a aplicação do látex (MELLO-SILVA *et al.*, 2010; LIMA *et al.*, 2012).

Augusto *et al.* (2015), expôs ovos e miracídios de *S. mansoni* e *B. glabrata* infectada a CL₅₀ (concentração subletal) do látex de *E. milii*, verificaram uma redução significativa na eliminação de cercárias nos moluscos. E quando as cercárias foram expostas ao mesmo látex, estas foram capazes de infectar hospedeiros definitivos, mas o número de vermes adultos formados em camundongos e a quantidade de ovos eliminados por eles diminuíram significativamente. O látex alterou a dinâmica parasitária de *S. mansoni* nos diferentes hospedeiros, reduzindo a eliminação de formas infectantes, levando uma alteração na dinâmica do parasito. Augusto (2016) descreveu a ação “esquistossomostática” do extrato aquoso do látex de *E. milii* var. *hislopii* sobre a cercária de *S. mansoni*, demonstrando que este produto interfere na evolução do parasito e na qualidade do verme, reduzindo significativamente a carga parasitária no hospedeiro definitivo e produção de ovos, que pode levar a redução da transmissão da esquistossomose.

Estudos em campo com o látex de *E. milii* foram realizados por Mendes *et al.* (1997) que realizaram teste em Comercinho, Minas Gerais e conseguiram eliminar a presença do hospedeiro intermediário pelo período de três meses consecutivos. Neste local houve recolonização dos sítios experimentais, que foi associada ao mecanismo de escape. Schall & Diniz (2001), ao aplicarem o látex bruto de *E. milii* var. *hislopii* na concentração de cinco ppm em uma região endêmica de Minas Gerais/Brasil, obtiveram a interrupção do ciclo do *S. mansoni* pela eliminação do molusco *B. glabrata* do ambiente por um período de 14 meses.

Sugerindo que as aplicações do látex sejam feitas periodicamente e ao longo da bacia hidrográfica do foco epidemiológico.

No entanto, experimentos com concentrações inferiores a CL_{50} do látex de *E. milii* são escassos na literatura e tornam-se importantes para verificar as alterações no hospedeiro intermediário, para avaliar seu potencial de ação. Visto que o uso de substâncias que ajudem a reduzir a transmissão da esquistossomose são estratégias importantes a serem estudadas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Nota Ética

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética Animal da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/IOC/FIOCRUZ 016/2015), de acordo com as orientações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3.2 Obtenção do Parasito e Infecção Experimental

3.2.1 Manutenção do ciclo de *Schistosoma mansoni* em laboratório

O ciclo de *S. mansoni* foi mantido em camundongos *Mus musculus* (linhagem Swiss) albinos fêmeas seguindo as normas de bioética e biossegurança no biotério do Pavilhão Lauro Travassos do IOC/Fiocruz (Figura 4A). Os exemplares de *B. glabrata* (linhagem BH) foram mantidos no Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental (LAPSA) em condições laboratoriais e infectados individualmente com sete a dez miracídios, segundo o procedimento descrito por Mello-Silva (2005) (Figura 4B). Após 35 dias de infecção os caramujos foram expostos, individualmente em borreis contendo cinco mL de água desclorada, à luz artificial durante o período de uma hora para a eliminação de cercárias (BRASIL, 2008) (Figura 4C). A infecção dos camundongos foi realizada subcutaneamente com 150 cercárias de *S. mansoni* no dorso do animal (PETERS & WARREN, 1969) (Figura 4D).

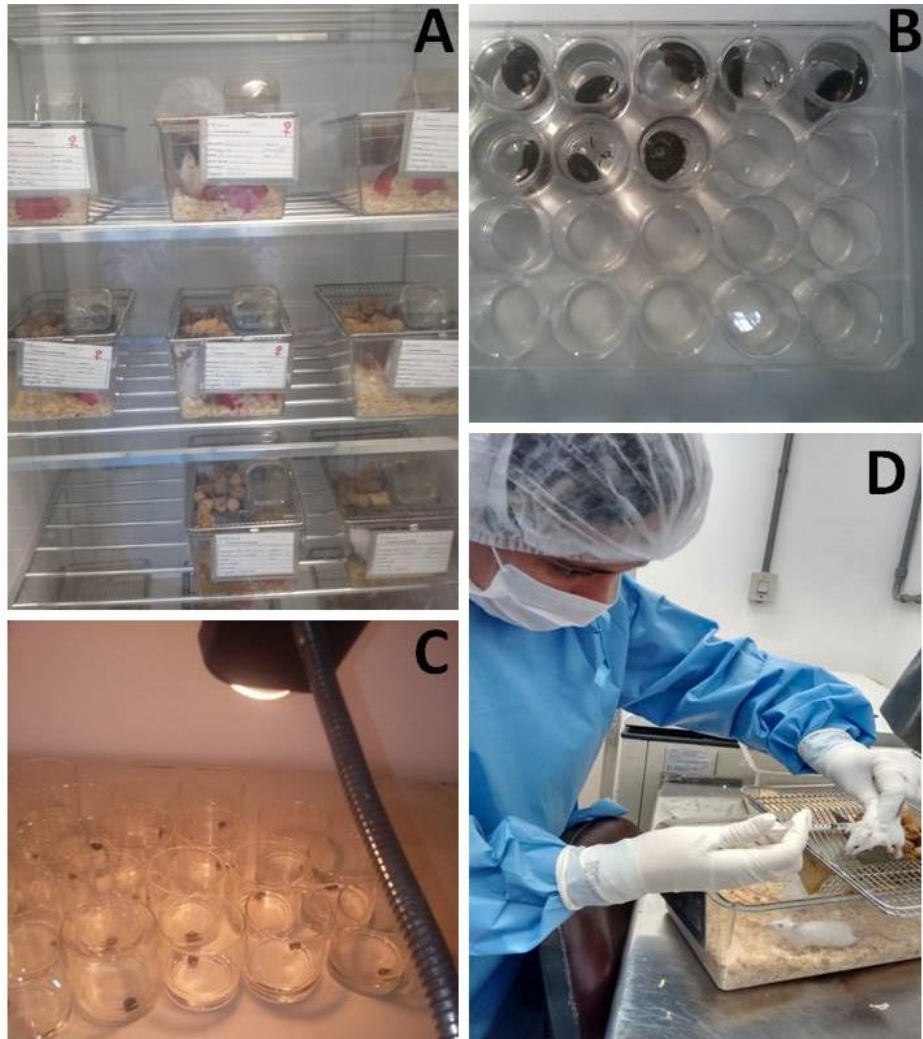


Figura 4 – A: Microisoladores contendo *Mus musculus* (linhagem Swiss) infectados por *Schistosoma mansoni* no biotério do Pavilhão Lauro Travassos/Fiocruz. B: Exemplos de *Biomphalaria glabrata* durante o processo de infecção por *Schistosoma mansoni*. C: Exemplos de *Biomphalaria glabrata* expostos à luz para eliminação de cercárias. D: Exemplo de *Mus musculus* (linhagem Swiss) durante o processo de infecção *Schistosoma mansoni*. Fonte: Elaborada pela autora.

3.3 Obtenção do Látex *Euphorbia milii*

As amostras do látex de *E. milii* (*syn. splendens*) var. *hislopii* foram coletadas na localidade Ilha do Governador (22°48'09''S/ 43°12'35''W), Rio de Janeiro, Brasil, seguindo os procedimentos de coleta descritos por Vasconcellos & Amorin (2003) (Figura 5A).

O preparo da solução aquosa é realizado a partir de um mililitro de látex bruto, adicionando, em um balão volumétrico, água tipo 2 até completar 1000 mL, obtendo assim a concentração de 1000 mg/L (solução estoque) (Figura 5B). Para todas as diluições foram utilizados balões volumétricos de 1000 mL e o volume de cada solução foi diluído em béqueres de 500 mL (Figura 5C).

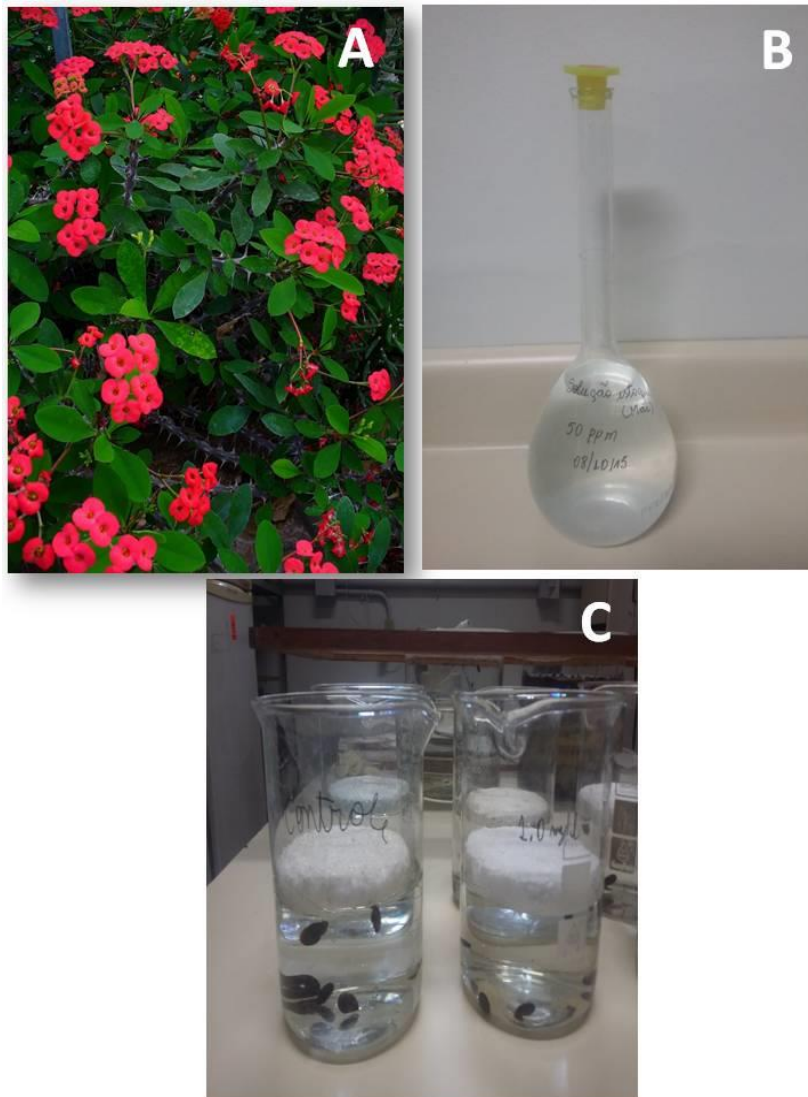


Figura 5 – A: *Euphorbia milii* var. *hislopii* (syn. *splendens*) (Des Moulins, 1826). B: Solução estoque látex de *Euphorbia milii*. C: Exemplar de *Biomphalaria glabrata* expostos ao látex de *Euphorbia milii*. Fonte: Elaborada pela autora.

3.4 Delineamento Experimental

Para este estudo foram utilizados quatro grupos de moluscos com 100 espécimes em cada: 1) Grupo IE: moluscos infectados por *S. mansoni* eliminando cercárias e exposto a concentração subletal do látex de *E. milii*; 2) Grupo E: moluscos não infectados e expostos a concentração subletal do látex de *E. milii*; 3) Grupo I: moluscos infectados por *S. mansoni* eliminando cercárias e não expostos ao látex de *E. milii* e 4) Grupo C: moluscos não infectados e não expostos ao látex. A concentração subletal (CL₅₀) do látex neste experimento foi 1,4 mg/L, sendo que utilizamos uma concentração menor que a subletal, 1,0 mg/L, a mesma utilizada por Mello-Silva e colaboradores (2006, 2007). Dez caramujos de cada grupo foram separados para contagem e caracterização de hemócitos na hemolinfa, cinco para a dosagem de óxido nítrico e outros cinco moluscos dos mesmos grupos foram utilizados para análise histológica.

3.4.1 Sobrevivência de *Biomphalaria glabrata* exposta ao látex de *Euphorbia milii*

Os moluscos foram colocados em béqueres, dez animais por recipiente, contendo 500 mL da solução subletal do látex de *E. milii* (concentração 1,0 mg/L) por um período de 24 horas. Após esse tempo foram avaliados quanto à taxa de mortalidade. Para esta análise, os batimentos cardíacos dos moluscos foram observados em microscópio estereoscópico. Aqueles animais que o coração estava parado foram considerados mortos.

3.4.2 Obtenção da hemolinfa de *Biomphalaria glabrata*

Amostras de hemolinfa de *B. glabrata* foram cuidadosamente coletadas em todos os grupos de moluscos por punção cardíaca usando uma seringa de um mL equipada com uma agulha de 13 x 0,38 mm (MELLO-SILVA *et al.*, 2006). A hemolinfa dos moluscos foi acondicionada em microtubos plásticos tipo Eppendorf de 1,5 mL e mantida em banho de gelo durante toda a coleta.

3.4.3 Contagem de hemócitos

Para a contagem total de hemócitos foi utilizado 10 µl da hemolinfa de dez animais de cada grupo individualmente. A hemolinfa foi diluída em (1:1) tampão de solução salina (18g L⁻¹ de D-glucose, 12,2g L⁻¹ de KCl, 0,6 gL⁻¹ de NaHCO₃, 380 mOsm, pH 7,8) (WHITTEN *et al.*, 2001). A contagem dos hemócitos circulantes foi determinada por observação direta em câmara de Neubauer por microscopia óptica de contraste de fase de acordo com Souza & Andrade (2012).

3.4.4 Caracterização dos hemócitos

A hemolinfa coletada individualmente de dez animais de cada grupo foi diluída em Millionig Carson (1:1) e após homogeneizada. Em seguida foi realizado o esfregaço na lâmina de vidro com 50 µL da diluição, e deixada secar por 24 horas em temperatura ambiente.

Posteriormente, as células foram fixadas em metanol (Merck®), coradas em Giemsa (Merck®) (1:9) e lavadas em água destilada. Depois as lâminas foram montadas em goma de damar e xilol e observadas em microscopia óptica. A diferenciação dos hemócitos foi baseada em Cavalcanti (2011). Para quantificação dos tipos de hemócitos de cada grupo foi selecionado uma amostra da área que reproduzisse as características da população total de células, correspondente a 10% da área total da lamínula (120mm²) (VIEIRA, 2016). Ressalta-se que a classificação dos hemócitos e suas proporções não estão padronizadas.

3.4.5 Dosagem de óxido nítrico

A hemolinfa de um *pool* de cinco caramujos foi armazenada a -18^oC até ser processada. O óxido nítrico apresenta característica evanescente, sendo assim, é necessário demonstrar sua produção de forma indireta, analisando a produção de nitrato ou nitrito. Para tal foi utilizado o procedimento do kit Griess Reagent System – Promega.

Foram colocados 50 µl (microlitros) de tampão cacodilato de sódio nos tubos e 50 µl de hemolinfa (pool de 5 moluscos) com capilar rinsado em PTU e mantidos no gelo. Foi diluído o padrão de nitrito 0.1M 1000 x em H₂O. As diluições são feitas seriadas do padrão na placa de 96 poços.

O primeiro poço corresponde a 100 µl de padrão, sendo passados 50 µl para o próximo poço. O segundo poço contém 50 µl de padrão mais 50 µl de H₂O, que foi homogeneizada e 10 µl foram transferidos para o próximo poço. Já o terceiro ocorreu da mesma forma do anterior.

Posteriormente foram colocados 50 µl das amostras na placa de 96 poços e adicionado 50 µl de sulfamida em todos os poços, no escuro por dez minutos (temperatura ambiente) e depois 50 µl de Ned (1 – naftil, etilenodiamina, dicloridrato ou N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride) em todos os poços também no escuro por dez minutos (temperatura ambiente). As leituras foram feitas em espectrofotômetro a 550 nm por um período de 10 minutos (HERER, 2005).

3.4.6 Análise histopatológica

A partir do experimento de exposição dos caramujos a concentração subletal do látex, cinco caramujos de cada grupo foram recuperados e colocados em solução aquosa de Nembutal 1% por quatro horas. Após retirou-se o excesso da substância e os indivíduos foram postos em placas de vidro e pressionados com uma lâmina. A concha foi fragmentada e a parte mole removida com o auxílio de uma pinça. Estas partes moles foram colocadas em Formol Millionig 10%, por 24 horas.

Após esse período, as partes moles dos caramujos foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol, diafanizadas com xilol e impregnadas em parafina líquida (60^oC), segundo a metodologia descrita por Tolosa *et al.* (2003). Posteriormente a inclusão, cortes longitudinais seriados de 5 µm de espessura foram feitos em micrótomo. O material foi corado com hematoxilina-eosina (HE), para análise histopatológica. Este procedimento seguiu o descrito por Faro *et al.* (2013).

3.5 Análise Estatística

Após os resultados obtidos foi feito uma estatística descritiva, com determinação de média e desvio-padrão. As amostras foram submetidas a um teste de comparação de duas ou mais médias populacionais (One-way-ANOVA), comparando a sobrevivência, concentração de óxido nítrico, a quantidade de hemócitos e a proporção dos tipos de hemócitos caracterizados nos quatro grupos estudados infectados e expostos (IE), expostos e não infectados (E), infectados e não expostos (I) e controle (C). As diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente não significativas quando $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas com software estatístico GraphPad Prism. 5.0.

4 RESULTADOS

4.1 Sobrevivência de *Biomphalaria glabrata* Exposta a Concentração Subletal do Látex de *Euphorbia milii*

A mortalidade de *B. glabrata* foi verificada após a exposição à concentração subletal 1,0 mg/L do látex de *E. milii*, nas primeiras 24 horas. Nos moluscos não infectados e expostos ao látex a porcentagem de sobreviventes foi de 88,5%. Para os caramujos infectados por *S. mansoni* e expostos ao látex, a sobrevivência foi de 66,6% (Figura 6).

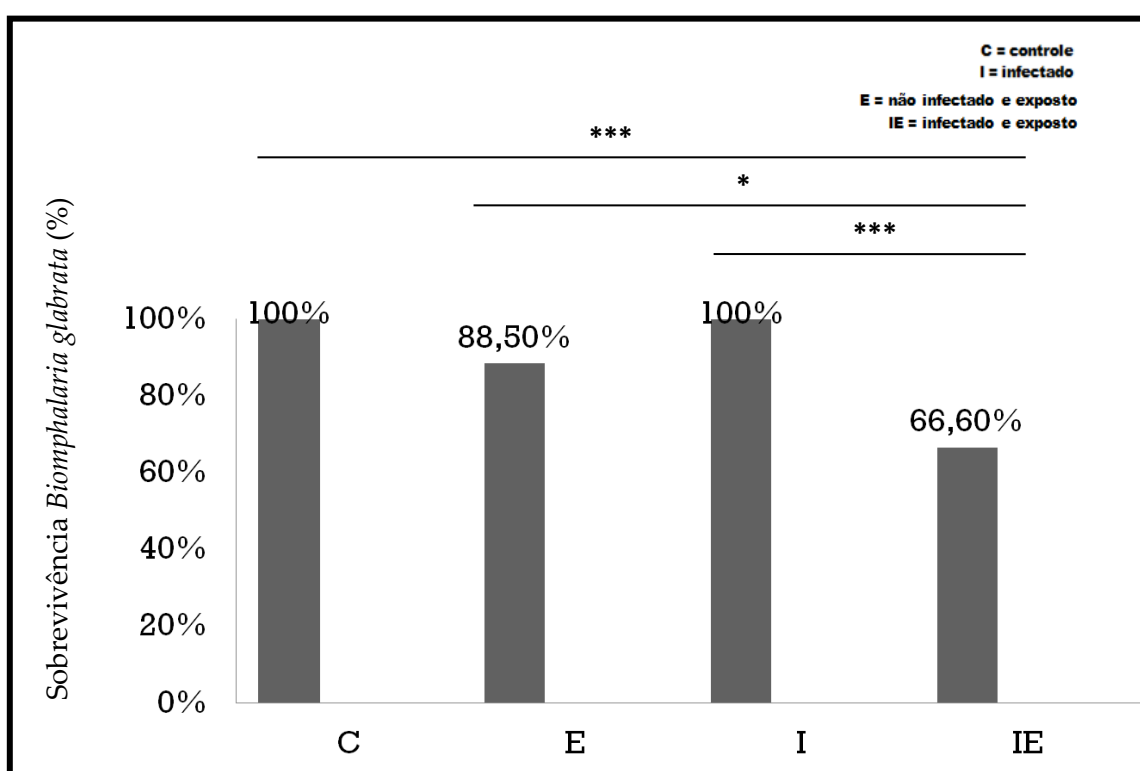


Figura 6 - Efeitos da exposição a concentração subletal do látex de *Euphorbia milii* na sobrevivência de *Biomphalaria glabrata* não infectados e infectados por *Schistosoma mansoni*. (*) diferença significativa na sobrevivência dos diferentes grupos.

4.2 Contagem de Hemócitos

A contagem de hemócitos de *B. glabrata* foi verificada logo após as 24 horas de exposição ao látex de *E. milii*. Quando comparados os grupos infectados e não expostos (I) e o grupo controle (C), houve uma redução significativa de hemócitos circulantes no grupo dos infectados (I) (28,3%). Nos grupos expostos a concentração 1,0 mg/L do látex, IE e E, o número de hemócitos no grupo IE foi significativamente maior, em relação ao somente exposto (E) (62,0%). Os grupos infectados por *S. mansoni*, IE e I, quando comparados, o grupo I apresentou uma quantidade de hemócitos menor em relação ao grupo IE (71.2%). Nos grupos não infectados, E e C, não foi evidenciada diferença entre eles (Figura 7).

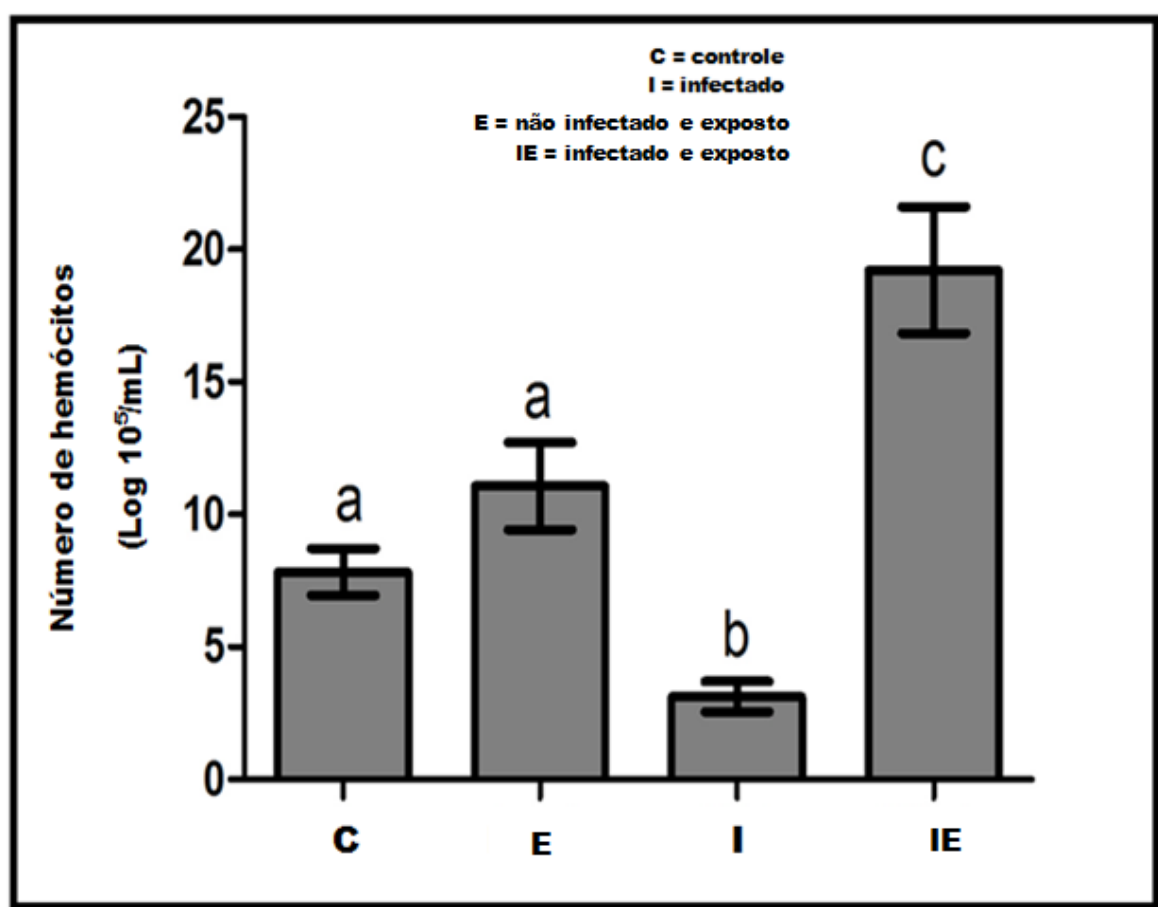


Figura 7 - Efeitos da exposição ao látex de *Euphorbia milii* no número de hemócitos circulantes na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* não infectados e infectados por *Schistosoma mansoni*. (a, b, c) letras diferentes demonstram diferença significativa no número de hemócitos nos diferentes grupos.

4.3 Caracterização dos Hemócitos

A caracterização de hemócitos foi realizada posteriormente a exposição de 24 horas ao látex de *E. milii*. Foram encontrados três tipos de hemócitos na hemolinfa de *B. glabrata*: células blásticas (Figura 8A), hialinócitos (Figura 8B) e granulócitos (Figura 8C). Em todos os grupos a proporção de hemócitos do tipo hialinócitos presente na hemolinfa foi superior, C (59,8%), E (47,5%), I (45,7%), IE (41,3%). O segundo maior tipo celular encontrado foi de o granulócitos nos grupos E (28,4%), I (36,8%) e IE (31,7%), exceto para o controle no qual as células blásticas representaram 27,5%, seguido dos granulócitos 12,5%. Nos demais grupos as células do tipo blásticas foram as células em menor proporção, E (24,0%), I (17,3%), IE (26,8%). Não encontramos diferença significativa entre os tipos celulares e os diferentes grupos analisados em 24 horas. Comparando os tipos de hemócitos em cada grupo, observamos diferença significativa entre o número de células do tipo hialinócitos e blásticas tanto nos grupos controle ($p \leq 0,0354$), como dos infectados ($p \leq 0,0354$) (Tabela 1).

Tabela 1 – Porporção dos tipos de hemócitos presentes na hemolinfa *Biomphalaria glabrata* não infectada e infectada por *Schistosoma mansoni* avaliando os efeitos da exposição do látex *Euphorbia milii*.

Tipo Celular	Caracterização celular na hemolinfa de <i>Biomphalaria glabrata</i> (média / porcentagem)			
	C	E	I	IE
Blástica	19,0 (27,5%) ^a	29,3 (24,0%) ^a	24,0 (17,3%) ^a	34,8 (26,8%) ^a
Granulócito	8,6 (12,5%) ^{a,b}	34,6 (28,4%) ^a	50,8 (36,8%) ^{a,b}	41,3 (31,7%) ^a
Hialinócito	41,25 (59,8%) ^b	58 (47,5%) ^a	63,2 (45,7%) ^b	53,7 (41,3%) ^a

(a, b) Letras diferentes demonstram diferença significativa dos tipos celulares em cada grupo de moluscos.

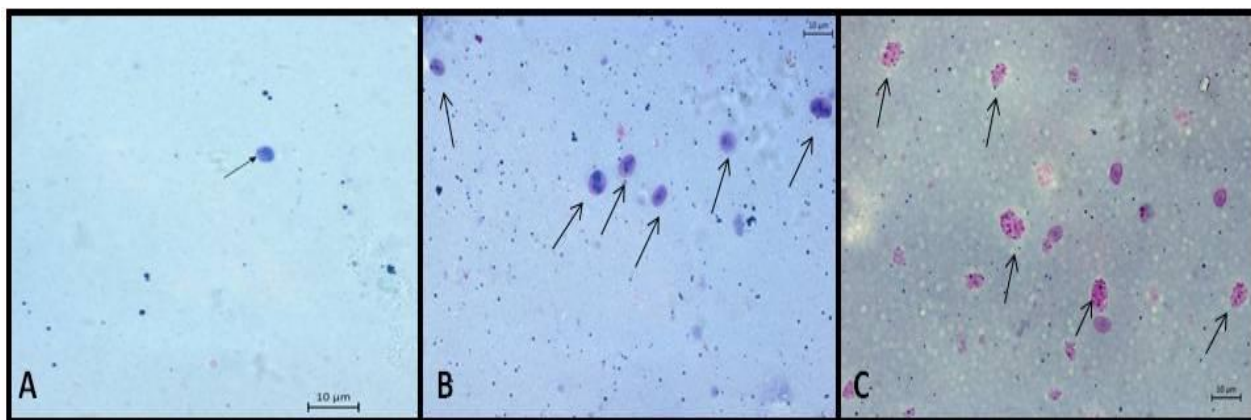


Figura 8 – Tipos de hemócitos presente na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata*. A: Célula blástica indicada pela seta. B: Hialinócitos indicados pelas setas. C: Granulócitos indicados pelas setas.

4.4 Dosagem de óxido nítrico (NO)

Os moluscos do grupo controle (C) apresentaram uma quantidade superior de nitrito e nitrato, representativos do óxido nítrico, quando comparado aos grupos infectados (I) ($p \leq 0,0001$), expostos não infectados (E) ($p \leq 0,0001$) e expostos infectados (IE) ($p \leq 0,0001$). Analisando os grupos expostos ao látex de *E. milii* e/ou infectados por *S. mansoni*, não houve diferença na produção de espécies de nitrogênio reativo entre o grupo de caramujos expostos e infectados (IE) e os grupos expostos não infectados (E) e apenas infectados (I). Por outro lado, a produção de NO foi menor no grupo exposto não infectado (E) comparado ao grupo infectado (I) (Figura 9).

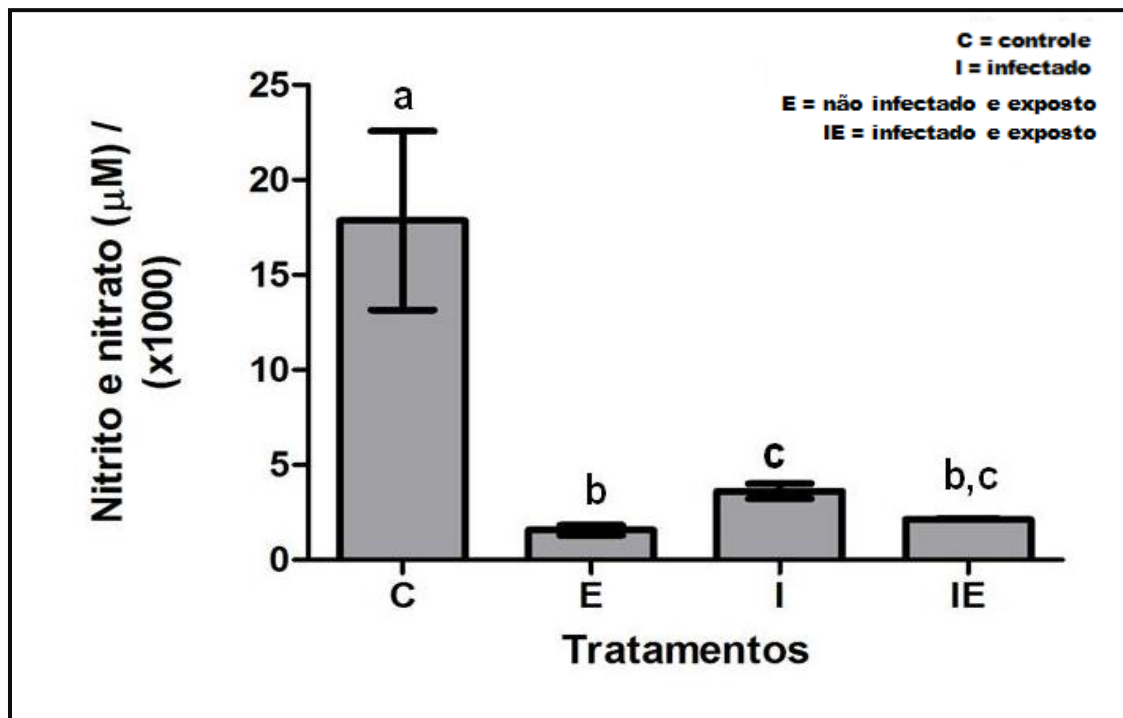


Figura 9 - Concentração de nitrito/nitrato (μM) na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* infectado e não infectados em função da exposição a concentração 1,0 mg/L do látex de *Euphorbia milii*. (a, b, c) Letras diferentes demonstram diferença significativa entre os grupos.

4.5 Análise histopatológica

As análises histológicas podem ser observadas nas figuras 10 e 11. A figura 10A, mostra o corte correspondente a glândula digestiva de *B. glabrata* não infectada do grupo controle (C), sem alterações. Nas figuras 10B, C, e D pode-se observar cortes longitudinais do rim, glândula digestiva e manto, respectivamente, de moluscos do grupo (E), expostos ao látex de *E. milii*. Foram observados neste grupo a presença de hemócitos teciduais no rim e na glândula digestiva (Figura 10B, C) sinalizados com uma seta na imagem. O manto apresentou um edema grande na membrana basal, que pode ser observado em detalhes na figura 10D.

Nos tecidos dos moluscos infectados houveram alterações teciduais (Figura 11) . O grupo controle (I) apresentou parasitismo intenso (*), com presença de hemócitos, indicado por setas (Figura 11A). Nos moluscos do grupo IE (Figura 11B, C, D) verificou-se que a exposição com látex de *E. milii* estimulou a proliferação dos hemócitos em diferentes tecidos como: tentáculo, manto (Figura 11D), mufla, , glândula digestiva (Figura 11C), rim (Figura 11B) e ovoteste (Figura 11E), promovendo uma redução do número de parasitas nos tecidos do grupo IE, quando comparado com Grupo I em todos os tecidos analisados. Na glândula digestiva e no rim do Grupo IE (Figura 11C, B) observou-se menor parasitismo, com intensa reação celular em torno dos esporocistos e presença de reação granulomatosa (círculo). No manto do grupo IE (Figura 11D) foi possível observar destruição tecidual (círculo), presença de muitos hemócitos (seta) e além de morte dos esporocistos (Fig. 11D). Este fato foi observado em uma linhagem susceptível e simpática de parasitos e moluscos.

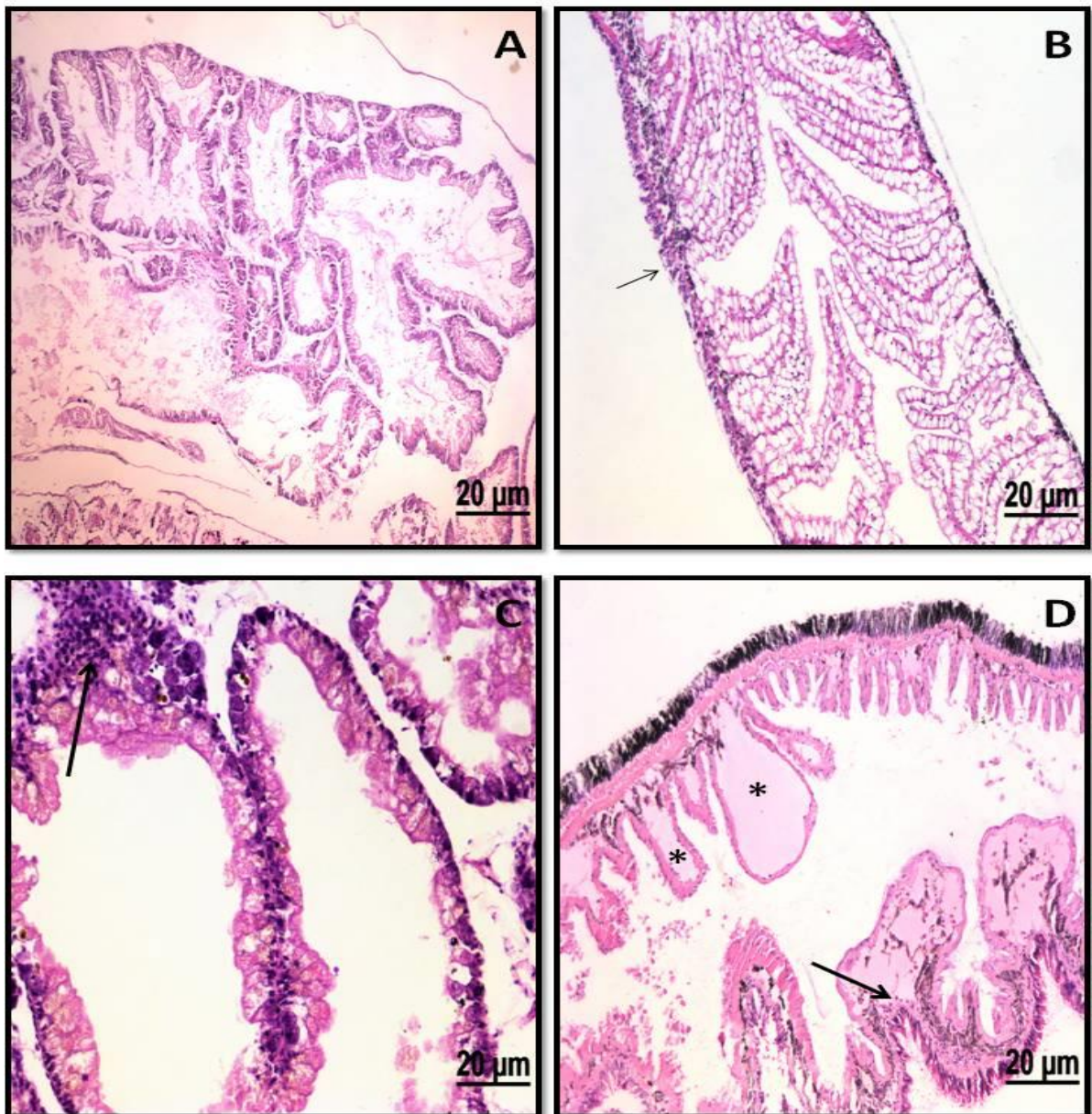


Figura 10 - A: *Biomphalaria glabrata* Grupo Controle não infectado região glândula digestiva sem alterações; B: Grupo não infectado exposto ao látex de *Euphorbia milii* região do rim, com discreta presença de hemócitos (seta). C: Grupo não infectado exposto ao látex de *E. milii* região da glândula digestiva, com mais hemócitos presentes no tecido (seta). D: Grupo não infectado exposto ao látex de *E. milii* região do manto, com edemas (*) e poucos hemócitos pelo tecido (seta).

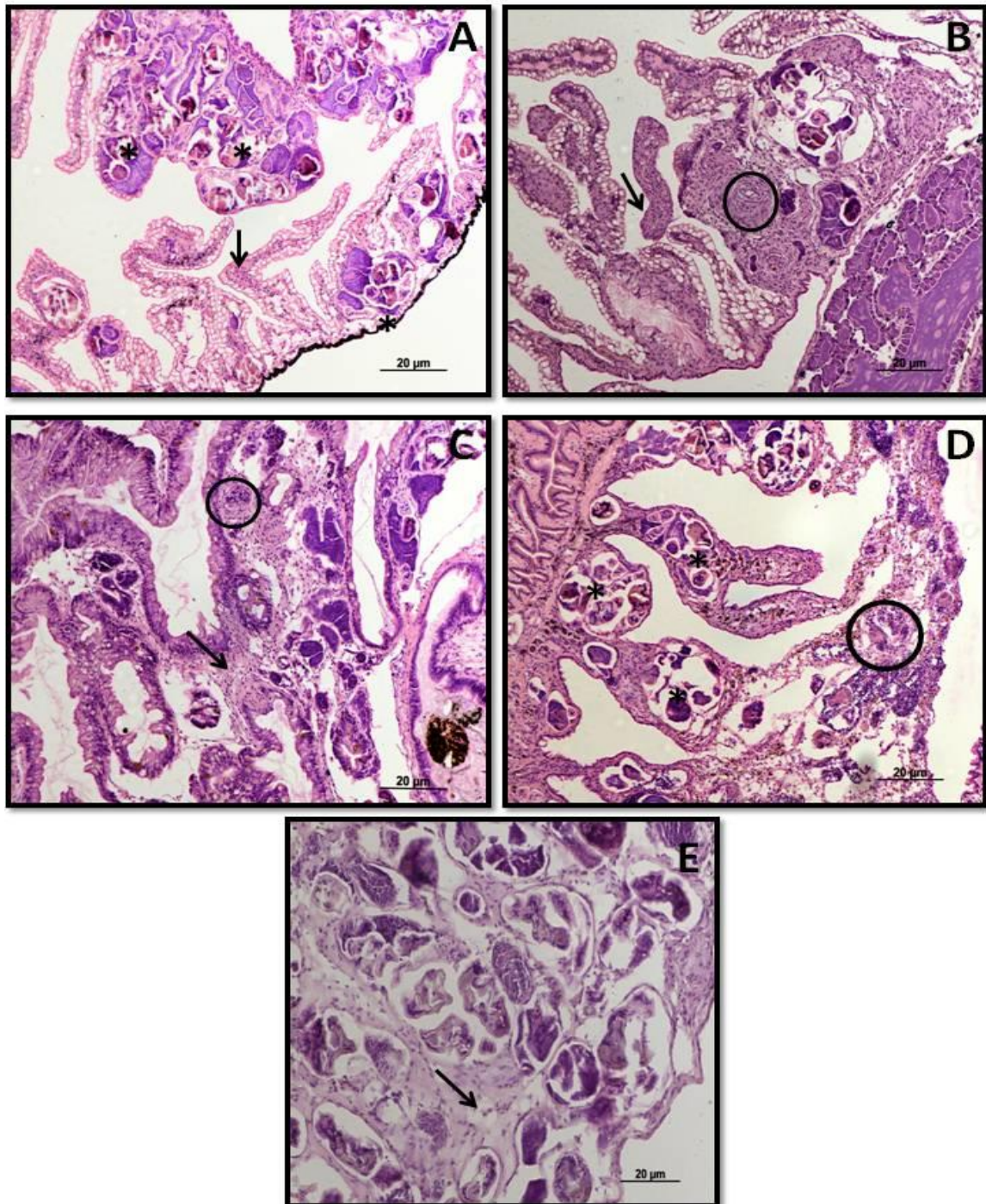


Figura 11 - A: *Biomphalaria glabrata* Grupo Controle infectado por *Schistosoma mansoni* região do rim e manto, com presença de esporocistos (*) e hemócitos teciduais (setas); B: Grupo infectado exposto ao látex de *Euphorbia milii* região do rim, apresenta denso infiltrado de hemócitos (setas) e reação do tipo granulomatosa (círculos), ambos em torno dos esporocistos. C: Grupo infectado exposto ao látex de *Euphorbia milii* região da glândula digestiva, com mesmos resultados do rim. D: Grupo infectado exposto ao látex de *E. milii* região do manto, com acúmulo de hemócitos, destruição do tecido e dos parasitos (circulo). E: Grupo infectado exposto ao látex de *E. milii* região ovoteste, apresentou presença de hemócitos (setas).

5 DISCUSSÃO

Diversos produtos químicos e naturais têm sido utilizados como moluscidas desde 1920, sem levar em consideração o impacto destes produtos nas relações entre hospedeiros e parasitos (CHANDLER, 1920; PLANK, 1945; GONNERT, 1961; DUNCAN, 1974; DUNLOP, 1976; YASURAOKA *et al.*, 1979; SORIA *et al.*, 1982; MENDES *et al.*, 1984). Apenas no final do século XX e início do século XXI, estudos foram realizados a fim de verificar as possíveis alterações provocadas por estes produtos no ciclo de vida e metabolismo dos moluscos e possíveis consequências nos ciclos parasitários (DIAS-GARCES & FERRER LOPEZ, 1996; SINGH & SINGH, 2000; MELLO-SILVA *et al.*, 2006; 2007; HAMED, 2010; AUGUSTO *et al.*, 2015).

Neste trabalho foi utilizada uma concentração menor que a CL₅₀ do látex de *E. milii* afim de verificar a ação do látex em concentrações baixas. Em moluscos infectados observou-se que estes foram mais sensíveis ao produto do que os não infectados, obtendo uma mortalidade três vezes maior no mesmo período de exposição que os não infectados. A ação seletiva deste produto em moluscos infectados foi descrita anteriormente por Mello-Silva *et al.* (2011) e Lima *et al.* (2012). Além disso, a ação de baixas concentrações do extrato aquoso do látex em *B. glabrata* foram demonstradas anteriormente por Mello-Silva *et al.* (2006) alterando o metabolismo de carboidratos e de proteínas de *B. glabrata* não infectada. No presente estudo uma concentração inferior a CL₅₀ em *B. glabrata* infectada foi capaz de influenciar o desencadeamento da resposta imune e provocar a morte dos parasitos no molusco.

Quanto às alterações na resposta imune celular e na produção de óxido nítrico dos moluscos frente a extrato aquoso do látex de *E. milii* var. *hislopii*, este trabalho mostrou resultados inédito sob o ponto de vista imunológico. A sinergia entre a infecção pelo *S. mansoni* e a exposição ao látex de *E. milii* em *B. glabrata* de uma linhagem suscetível promoveu proliferação de hemócitos circulantes e teciduais e uma inibição na produção de óxido nítrico, um dos elementos presentes na resposta imune humoral. Além disso, observou-se a destruição de parasitos nos tecidos e a presença de uma estrutura granulomatosa. Na literatura vigente e atual demonstra que as linhagens suscetíveis reduzem a motilidade, a capacidade fagocítica e ativação de novos hemócitos, o que permite o desenvolvimento do parasito (PINAUD *et al.*, 2016). Fato este antagônico ao ocorrido neste experimento com moluscos submetidos aos dois fatores de estresse. A suscetibilidade dos moluscos ao parasito está relacionada à incorporação de antígenos solúveis presentes na hemolinfa dos moluscos pelos esporocistos primários (NEGRÃO-CÔRREA, 2008; 2012), semelhante ao que ocorre no hospedeiro vertebrado e que é chamado mimetismo antigênico. Esta incorporação constitui uma estratégia que permite a evasão do parasito. O quadro imunológico observado neste estudo se assemelha ao descrito na literatura para linhagens resistentes a infecção, principalmente a resposta imune celular no tecido dos moluscos com formação de granuloma, que é característica de linhagens resistentes (BORGES & ANDRADE, 2003; NEGRÃO-CORRÊA *et al.*, 2008). Sugere-se que a exposição ao látex de *E. milii* em moluscos infectados possa alterar a ligação dos hemócitos aos esporocistos de *S. mansoni*, passando a reconhecê-los como não *self* e em consequência desencadear a resposta imune celular característica de moluscos resistentes a infecção.

Os moluscos não infectados e expostos ao látex de *E. milii* apresentaram número de hemócitos circulantes semelhantes ao grupo controle, todavia foi possível verificar a presença de hemócitos teciduais, não observado no grupo controle. Em relação à produção de óxido

nítrico pode-se observar uma supressão significativa comparada com o grupo controle. Segundo Matricón-Gondran & Letocart (1999) a ativação de hemócitos varia com o estímulo, podendo ser rápido e intenso, em nosso trabalho após 24 horas já foi visualizada uma atividade hemocitária nos tecidos. Estes mesmos autores identificaram que os hemócitos teciduais são capazes de responder de forma mais ativa a substâncias de viscosidade semelhante ao látex sintético, pode ser o caso do látex de *E. milii*.

Cavalcanti e colaboradores (2012) realizaram um estudo da morfologia dos hemócitos de *B. glabrata* e observaram três tipos celulares: células blásticas, granulócitos e hialinócitos, este último dividido em três subtipos. O hialinócito foi o tipo de hemócito mais frequente, seguido por granulócitos e células blásticas. No presente estudo encontramos os mesmos tipos celulares de hemócitos em *B. glabrata*. Sendo o hialinócito o mais encontrado, seguido também por granulócito e células blásticas, exceto no grupo C, o percentual de hialinócitos, foi seguido de células blásticas e por último granulócitos. Tal variação pode estar relacionada ao fato deste grupo não ter sofrido estresse.

Quanto à produção de óxido nítrico o grupo de moluscos somente expostos ao látex (grupo E) apresentou a menor concentração encontrada comparando com os demais grupos. Os moluscos infectados (grupo I) e os infectados e expostos ao látex de *E. milii* (grupo IE) também apresentaram supressão da produção de óxido nítrico comparado com o grupo controle. O grupo controle (C) apresentou maior produção de NO, segundo Zahoor *et al.* (2009), os caramujos não infectados, mas pertencentes a linhagens suscetíveis ao parasito apresentam um aumento na quantidade de óxido nítrico basal, semelhante ao observado neste trabalho. Segundo Hahn *et al.* (2000) moluscos infectados suscetíveis à infecção reduzem a produção de óxido nítrico, pois os hemócitos que reconhecem o parasito como *self*, não desencadeiam a resposta, permitindo o desenvolvimento do parasito, corroborando com os resultados deste estudo.

Caramujos submetidos ao estresse fisiológico da infecção pelo *S. mansoni* e exposição à moluscicidas modificam os produtos nitrogenados de excreção, deixando de ser ureotélicos e passando a uricotélicos (BECK *et al.*, 1983; MELLO-SILVA *et al.*, 2011). Sabe-se que a arginina participa diretamente do ciclo da ureia em moluscos de forma análoga aos mamíferos. Esta redução de óxido nítrico, que é arginina dependente, está relacionado provavelmente às alterações do ciclo da ureia, observado por Mello-Silva *et al.* (2006; 2011). Sugere-se que concentrações subletais do látex podem interferir na formação da arginina e reduzir a produção de óxido nítrico. Além disso, em moluscos infectados ocorre o consumo direto de L-arginina pelo parasito para desenvolvimento das formas larvares no hospedeiro (NEGRÃO-CORREIA *et al.*, 2008).

Vincendeau *et al.* (2003) associaram a ativação da arginase (enzima que quebra a arginina) com o mecanismo de escape de parasitos, a ação tóxica do óxido nítrico. Os parasitos promovem um mecanismo de escape direto com o mimetismo antigênico, minimizando a ativação da produção de óxido nítrico pelo hospedeiro e indireto com a inibição da produção de arginina ou com o seu consumo para o desenvolvimento larvário. Fato este observado em moluscos infectados não expostos (grupo I), suprimindo através do mimetismo antigênico a resposta imune celular e humoral mediada pelo óxido nítrico.

Lesões teciduais em moluscos frente ao uso de moluscicidas foram demonstradas por Adewunmi & Ogbe (1986) e Bode *et al.* (1996) com extrato de *Tetraptera tetraptera* em *B. glabrata*, Araújo *et al.* (2002) e Pile *et al.* (1998) com extrato de *E. splendens* (*E. milii*) em *Lymnaea columella*. Esses autores relataram o acúmulo de líquido, provavelmente o extrato aquoso das plantas nos tecidos conjuntivos e degeneração tecidual principalmente do epitélio. Pile *et al.* (1998) utilizaram o extrato aquoso da mesma planta, *E. milii*, e em concentrações

semelhantes mas com o molusco dulcícola *Lymnaea columella*, os autores verificaram lesões caracterizadas por degeneração, necrose e acúmulo de líquido na glândula digestiva e no rim, em exemplares submetidos a concentrações a partir de 0,47 ml/L, conforme descrito no artigo. Neste trabalho também foram observadas lesões na glândula digestiva e no manto, possíveis de acúmulo de líquido e edemas no epitélio do rim.

Considerando nossos achados em relação à resposta imune dos moluscos infectados e expostos ao látex de *E. milii* e os dos demais autores quanto a biodegradabilidade do látex de *E. milii* em trinta dias (SCHALL *et al.*, 1992; VASCONCELLOS & AMORIN, 2003a), a ação imediata do produto após 24 horas no comportamento dos moluscos não infectados (ALBERTO-SILVA, 2016) e a redução significativa (78%) da eliminação de cercarias em moluscos infectados (AUGUSTO *et al.*, 2015), o látex de *E. milii* é o produto natural em concentrações subletais promissor para ser usado em áreas endêmicas no controle da transmissão da esquistossomose. Sendo este trabalho pioneiro a estudar a ação de moluscidas naturais no desencadeamento da resposta imune de *B. glabrata* infectada com *S. mansoni*, tendo a concentração subletal do extrato aquoso do látex de *E. milii* como modelo.

6 CONCLUSÕES

- Nos moluscos não infectados e infectados a exposição ao látex foi capaz de promover a ativação da resposta imune celular e uma supressão da produção de óxido nítrico, além de ocasionar danos teciduais.
- Foram encontrados três tipos de hemócitos e a frequência destes foi influenciada pelos fatores de estresse, como a infecção e a exposição ao látex.
- Ocorreu um sinergismo entre a infecção e a exposição ao látex, proporcionando nos moluscos infectados e expostos um aumento da quantidade hemócitos circulantes e teciduais, lesões granulomatosas, destruição de parasitos, mesmo sendo uma cepa de moluscos suscetível à infecção.
- Sendo assim a exposição de *Biomphalaria glabrata* ao látex de *Euphorbia milii*, mesmo em baixas concentrações, influenciou no desencadeamento da resposta imune celular dos moluscos e torna este produto ainda mais promissor no controle da transmissão da esquistossomose.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEMA, C. M.; VAN DEUTEKOM-MULDER, E. C.; VAN DER KNAAP, W. P.; SMINIA, T. Schistosomicidal activities of *Lymnaea stagnalis* haemocytes: the role of oxygen radicals. **Parasitology**, v.109, p. 479-85, 1994.

ADEMA, C. M.; ARGUELLO, D. F.; STRICKER, S. A.; LOKER, E. S. A time-lapse study of interactions between *Echinostoma paraensei* intramolluscan larval stages and adherent hemocytes from *Biomphalaria glabrata* and *Helix aspersa*. **J Parasitol**, v. 80, p. 719-27, 1997.

ADEWUNMI, C. O. & OGBE, M. G. The histopathology of *Tetrapleura tetraptera* extract on some fresh water snails. **Fitoterapia**, n. 5, p. 571-4, 1986.

ALBERTO-SILVA, A. C. **Alterações locomotoras e reprodutivas em *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (PULMONATA: PLANORBIDAE) hospedeiro intermediário de *Schistosoma mansoni* SAMBON, 1907 (TREMATODA: SCHISTOSOMATIDAE) sob condições de estresse.** Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 97p. Dissertação Mestrado, 2016.

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. 157-9, 2002.

AUGUSTO, R. C. **Efeito da exposição de cercárias de *Schistosoma mansoni* ao látex de *Euphorbia milii* var. *hislopii* no desenvolvimento das formas adultas no hospedeiro definitivo.** Fundação e Instituto Oswaldo Cruz. 129 p. Tese de Doutorado, 2016.

AUGUSTO, R. C.; FRIANI, G. VASCONCELLOS, M. C.; RODRIGUES, M. L. A.; MELLO-SILVA, C. C. *Schistosoma mansoni*: Phytochemical effect on aquatic life cycle. **Open J Vet Med**, v. 5, p. 127-32, 2015.

AUGUSTO, R. C.; MAGALHÃES, A. C. S.; MELLO-SILVA, C. C. C. The influence of population density and food intake on the reproductive biology of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca) and the amount of calcium in snails experimentally infected with *Schistosoma mansoni* (Trematoda). **Rev Patol Trop**, v. 41, p. 83-92, 2012.

BAKER, F. C. General morphology. In: BAKER, F. C.; VAN CLEAVE, H. J. **The molluscan Family Planorbidae.** Urbana: University of Illinois Press, 1945.

BASCH, P. F. Intermediate host specificity in *Schistosoma mansoni*. **Exp Parasitol**, v. 39, p. 150-69, 1976.

BARROCCO, M. A.; STEIL, A. A.; GARGIONI, R. Morphological characterization of the hemocytes of the pulmonate snail *Biomphalaria tenagophila*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 83, p. 73-83, 1993.

BAYNE, C. J.; BUCKELEY, P. M.; DEWAN, P. C. Citotoxicity of hemocytes from susceptible snail hosts for sporocysts in plasma from resistant *Biomphalaria glabrata*. **Exp Parasitol**, v. 50, p. 409-16, 1980.

BAYNE, C. J.; LOKER, E. S.; YUI, M. A.; STEPHENS, J. A. Immune-recognition of *Schistosoma mansoni* primary sporocysts may require specific receptors on *Biomphalaria glabrata* hemocytes. **Parasitol Immun**, v. 6, p. 519-28, 1984.

BECK, G.; O'BRIEN, R. F.; HABICHT, G. S.; STILLMAN, D. L.; COOPER, E. L.; RAFTOS, D. A. Invertebrate cytokines III: Invertebrate interleukin-1-like molecules stimulate phagocytosis by tunicate and echinoderm cells. **Cell Immunol**, v. 146, p.: 284-99, 1983.

BECKMAN, J. S.; KOPPENOL, W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. **Am J Physiol**, v. 271, p. 1424-37, 1996.

BODE, A. U. D.; CLEMENT, ADEWUNMI, C. O.; DORFLER, G.; BECKER, W. The effects of extracts from *Tretapleura Teraptera* (Taub.) and Bayluscide® on cells and tissue structures of *Biomphalaria glabrata* (Say). **J Ethnopharmacol**, v. 50, p. 103-13, 1996.

BORGES, C. M. C. & ANDRADE, Z. A. Extra-cellular matrix changes in *Schistosoma mansoni*-infected *Biomphalaria glabrata*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 135-9, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica**: diretrizes técnicas: Programa de Vigilância e Controle de Esquistossomose (PCE). 2 ed. Brasília, 2008. 178 p.

_____. _____. Coordenação Geral de Doenças Negligenciadas. Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose. **Situação epidemiológica da esquistossomose no Brasil**. Brasília, 2011.

_____. _____. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Vigilância da Esquistossomose Mansoni: diretrizes técnicas**. 4 ed. Brasília, 2014. 144 p.

CAVALCANTI, M. G. S. **Caracterização dos hemócitos de *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria straminea* sadios e infectados por *Schistosoma mansoni***. Universidade Federal de Pernambuco. 157 p. Tese Doutorado, 2011.

CAVALCANTI, M. G. S.; FILHO, F. C.; MENDONÇA, A. M. B.; DUARTE, G. R.; BARBOSA, C. C. G. S.; DE CASTRO, C. N. M. B.; ALVES, L. C.; BRAYNER, F. A. Morphological characterization of haemocytes from *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria straminea*. **Micron**, v. 43, p. 285-91, 2012.

CARVALHO, O. S.; SCHOLTE, R. G. C.; AMARAL, R. S. **Distribuição dos hospedeiros intermediários de *Schistosoma mansoni* no Brasil**. In: Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância. Vigilância e Controle de Moluscos de Importância Epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde, 2007.

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. Funcional morphology and biochemistry of molluscan phagocytes. Review. **Ann N Y Acad Sci**, v. 266, p. 343-79, 1975.

CHENG, T. C.; & AULD, K. R. Hemocytes of the pulmonate gastropod *Biomphalaria glabrata*. **J Invertebr Pathol**, v. 30, p. 119-22, 1977.

CONNORS, V. A.; BURON, I.; GRANATH, W. O. *Schistosoma mansoni*: interleukin-1 increases phagocytosis and superoxide production by hemocytes and decreases output of cercariae in schistosome-susceptible *Biomphalaria glabrata*. **Exp Parasitol**, v. 80, p. 139-48, 1995.

CORREA, P. M. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Imprensa Nacional, Ministério da Agricultura. Instituto de Desenvolvimento Florestal, Rio de Janeiro, 1984, 533 p.

COUSTAU, C. & YOSHINI, T. P. *Schistosoma mansoni*: modulation of hemocytes surface polypeptides detected in individual snails, *Biomphalaria glabrata*, following larval exposure. **Exp Parasitol**, n. 79, p. 1-10, 1998.

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 cercaria. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 93, p. 235-37, 1998.

DIAZ-GARCES, R. & FERRER LOPEZ, J. R. Effect of lethal doses of plants of the cardiac activity oviposition of *Biomphalaria havanensis*. **Rev Cubana Med Trop**, v. 48, p. 15-20, 1996.

DIKKEBOOM, R.; VAN DER KNAAP, W. P. W.; VAN DEN BOVENKAMP, W.; TIJNAGEL, J. M. G. H.; BAYNE, C. J. The production of toxic oxygen metabolites by hemocytes of different snail species. **Dev Comp Immunol**, v. 12, 509-20, 1988.

DUNCAN, J. A review of the development and application of molluscicides in schistosomiasis control. In: **Molluscicides in Schistosomiasis Control**, T. C. Cheng (Ed.). American Press, p. 9-40, 1974.

DUNLOP, R. W. **Synthesis of isotopically labeled nicotinilides and evaluation of their molluscicidal properties**. Ph. D. thesis. University of London, 1976.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. D. G. Revisão sobre óxido nítrico. **J Bras Patol Med Lab**, v. 39, n. 4, p. 343-50, 2003.

EL MOUSSAOUI, A. N.; PAUL, C.; WINTJENS, R.; VINCENTELLI, J.; AZARKAN, M.; LOOZE, Y. Revisiting the enzymes stored in the laticifers of *Carica papaya* in the context of their possible participation in the plant defence mechanism. **Cell Mol Life Sci**, v. 58, p. 556-70, 2001.

FARO, M. J.; PERAZZINI, M.; CORRÊA, L. R.; MELLO-SILVA, C. C.; PINHEIRO, J.; MOTA, E. M.; DE SOUZA, S.; DE ANDRADE, Z.; JÚNIOR, A. M. Biological, biochemical and histopathological features related to parasitic castration of *Biomphalaria glabrata* infected by *Schistosoma mansoni*. **Exp Parasitol**, v. 134, p. 228-34, 2013.

FERNANDEZ, M. A. & THIENGO, S. C. Susceptibility of *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) from Serra da Mesa Dam, Goiás, Brazil to infection with three strains of *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 59-60, 2002.

FRIED, B. An update on hemocytes in *Biomphalaria* snails. **J Hematol Oncology**, v. 2, p. 20-6, 2016.

FRYER, S. E. & BAYNE, C. J. Phagocytosis of látex beads by *Biomphalaria glabrata* hemocytes is modulated in a strain-specific manner by absorbed plasma components. **Dev Comp Immunol**, v. 20, p. 23-337, 1996.

FRYER, S. E.; HULL, C. J.; BAYNE, C. J. Phagocytosis of yeast by *Biomphalaria glabrata*: carbohydrate specificity of receptors and a plasma opsonin. **Dev Comp Immunol**, v. 13, p. 9-16, 1989.

GRANATH, W. O. JR. & YOSHINO, T. P. *Schistosoma mansoni*: passive transfer of resistance by serum in the vector snail, *Biomphalaria glabrata*. **Exp Parasitol**, v. 58, p. 188-93, 1984.

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

HAHN, U. K.; BENDER, R. C.; BAYNE, C. J. Production of reactive oxygen species by hemocytes of *Biomphalaria glabrata*: carbohydrate-specific stimulation. **Dev Comp Immunol**, v. 24, p. 531-41, 2000.

HAMED, M. A. Strategic control of schistosome intermediate host. **Asian J Epidemiol**, v. 3, p.123-40, 2010.

HERER, V. G. S. **Análise da concentração de óxido nítrico na saliva de indivíduos portadores de doença periodontal**. Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. 42 p. Dissertação de Mestrado, 2005.

HIBBS, J. B.; TAINTORA, R. R.; VAVRINA, Z.; RACHLIN, E. M. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. **Biochem Biophys Reserc Comm**, v. 157, p. 87- 94, 1988.

HOFFMANN, J. A. The immune response of *Drosophila*. **Nature**, v. 426, p. 33-8, 2003.

JOHNSTON, L. A. & YOSHINO, T. P. Larval *Schistosoma mansoni* excretory-secretory glycoproteins (ESPs) bind to hemocytes of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda) via surface carbohydrate binding receptors. **J Parasitol**, n. 87, p. 786-93, 2001.

KATZ, N. & PEIXOTO, S. V. Critical analysis of the estimated number of *Schistosomiasis mansoni* carries in Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 33, p. 303-8, 2000.

LAVINE, M. D. & STRAND, M. R. Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 32, p. 1295-309, 2002.

LEIPPE, M. & RENWRANTZ, L. Release of cytotoxic and agglutinating molecules by *Mytilus* hemocytes. **Dev Comp Immunol**, v. 12, p. 297-308, 1988.

LIE, K. J. & HEYNEMAN, D. Studies on resistance in snails: a specific tissue reaction to *Echinostoma lindoense* in *Biomphalaria glabrata*. **Int J Parasitol**, v. 15, p. 621-6, 1975.

LIE, K. J.; HEYNEMAN, D.; YAU, D. The origin of amoebocytes in *Biomphalaria glabrata*. **J Parasitol**, v. 61, p. 574-6, 1975.

_____. Molluscan host reactions to helminthic infection. *Imunne Responses in Parasitic Infections: Immunology, Immunopathology and Immunoprophylaxis*. **Arthropodes and Invertebrates**, Editora: CRC Press, p. 340, 1987.

LIMA, M. G.; AUGUSTO, R. C.; VASCONCELLOS, M. C.; MELLO-SILVA, C. C.; PINHEIRO, J. ; PINHEIRO, J. Metabolic changes in *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni* exposed to latex of *Euphorbia milii* solution versus times of preparation. **J Nat Prod**, v. 5, p. 222-32, 2012.

LOKER, E. S.; BAYNE, C. J.; BUCKLEY, P. M.; KRUSE, K. T. Ultrastructure of encapsulation of *Schistosoma mansoni* mother sporocysts by hemocytes of juveniles of the 10-R2 strain of *Biomphalaria glabrata*. **J Parasitol**, v. 68, p. 84-94, 1982.

LOKER, E. S.; YUI, M. A.; BAYNE, C. J. *Schistosoma mansoni*: Agglutination of sporocysts, and formation of gels on miracidia transforming in plasma of *Biomphalaria glabrata*. **Exp Parasitol**, v. 58, p. 56-62, 1984.

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

MARTINS-SOUZA, R. L.; PEREIRA, C. A. J.; MARTINS FILHO, O. A.; COELHO, P. M. Z.; CORRÊA JR, A.; NEGRÃO-CORRÊA, D. Differential lectin labelling of circulating hemocytes from *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria tenagophila* resistant or susceptible to *Schistosoma mansoni* infection. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 185-92, 2006.

MARTINS-SOUZA, R. L.; PEREIRA, C. A. J.; COELHO, P. M. Z.; MARTINS FILHO, O. A.; NEGRÃO-CORRÊA, D. Flow cytometry of the circulating haemocytes from *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria tenagophila* following *Schistosoma mansoni* infection. **Parasitology**, v. 136, p. 67-76, 2009.

MATRICON-GONDRAN, M. & LETORCART, M. Internal defenses of the snail *Biomphalaria glabrata*. Characterization of hemocytes and fixed phagocytes. **J Inverteb Pathol**, v. 74, p. 224-34, 1999.

MENDES, N. M.; PEREIRA, J. P.; SOUZA, C. P.; OLIVEIRA, M. L. L. Ensaios preliminares em laboratório para verificar a ação moluscicida de algumas espécies da flora brasileira. **Rev Saúde Públ**, v. 18, p. 348-54, 1984.

MENDES, N. M.; VASCONCELLOS, M. C.; BATISTA, 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. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 92, p. 719-24, 1997.

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* N. E. B. (Euphorbiaceae). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 103 p. Tese Doutorado, 2005.

MELLO-SILVA, C. C.; PINHEIRO, J.; VASCONCELLOS, M. C.; 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). **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 3-8, 2006.

MELLO-SILVA, C. C.; VILAR, M. M.; BEZERRA, J. C.; 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**, Rio de Janeiro, v. 102, p. 671-4, 2007.

MELLO-SILVA, C. C.; VILAR, M. M.; VASCONCELLOS, M. C.; PINHEIRO, J.; RODRIGUES, M. L. A. Carbohydrate metabolism alterations in *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni* and exposed to *Euphorbia splendens* var. *hislopii* latex. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, n.4, p. 492-5, 2010.

MELLO-SILVA, C. C.; VASCONCELLOS, M. C.; BEZERRA, J. C. B.; RODRIGUES, M. L. A.; PINHEIRO, J. The influence of exposure to *Euphorbia splendens* var. *hislopii* latex on the concentrations of total proteins and nitrogen products in *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni*. **Acta Trop**, v. 117, p. 101-4, 2011.

MORRIS, S. M. e BILLIAR, T. R. New insights into regulation of inducible nitric oxide synthesis. **Am J Physiol**, v. 266, p. 829-39, 1994.

NEGRÃO-CORRÊA, D. A.; COELHO, P. M. Z.; ANDRADE, Z. A.; MARTINS-SOUZA, R. L.; PEREIRA, C. A. J. “*Biomphalaria* e *Schistosoma mansoni*: papel do sistema interno de defesa do molusco na susceptibilidade ao parasito”. In: ***Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar**, Editora Fiocruz, Cap. 15, p. 486-509, 2008.

NEGRÃO-CORRÊA, D.; Mattos, A. C. A.; PEREIRA, C. A. J.; MARTINS-SOUZA, R. L.; COELHO, P. M. Z. Interaction of *Schistosoma mansoni* sporocysts and hemocytes of *Biomphalaria*. **J Parasitol Res**, v. 2012, p. 1-6, 2012.

NEWTON, W. L. The inheritance of susceptibility to infection with *Schistosoma mansoni* in *Australorbis glabratus*. **Exp Parasitol**, v. 84, p. 242-57, 1952.

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. **J Environ Sci Health**, v. 34, p. 289-303, 1999.

PARAENSE, W. L. Planorbídeos hospedeiros intermediários de *Schistosoma mansoni*. In: CUNHA, A. S. **Esquistossomose mansônica**. São Paulo: Sarvier, 1970.

_____. Estudo atual da sistemática dos planorbídeos brasileiros. **Arquivos do Museu Nacional**, Rio de Janeiro, v. 55, p. 105-128, 1975.

_____. The Schistosomose vectores in the Americas. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 7-16, 2001.

_____. “Histórico do gênero *Biomphalaria*, morfologia e sistemática morfológica”. In: **Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar**, Editora Fiocruz, Cap. 8, p. 286-308, 2008.

_____. “Planorbídeos e outros moluscos hospedeiros de helmintos”. In: *Rey L. 3^aed Parasitologia*, **Guanabara Koogan**, Cap. 63, p. 769-783, 2011.

PARAENSE, W. L. & DESLANDES, N. Observations on the morphology of *Australorbis glabratus*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 53, p. 87-103, 1955.

PLANK, H. K. All parts of desert palm toxic to snails. **Annual Reporto f the U. S. Departament of Agriculture**, v. 24, p. 122, 1945.

PEREIRA, L. H; VALADARES, T. E.; CUNHA, M. L.; CORREA, M. C. Recovery of young daughter sporocysts from snails infected with *Schistosoma mansoni*. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 78, p. 563, 1984.

PETERS, P. A. & WARREN, K. S. A rapid method of infecting mice and other laboratory animals with *Schistosoma mansoni*: subcutaneous infection. **J Parasitol**, v. 55, p. 558, 1969.

PILE, E.; COELHO, B.; SANTOS, J. A. A. Alteraciones histopatológicas em *Lymnaea columella* (PULMONATA: LYMNAEIDAE), hoesped intermediario de *Fasciola hepatica* (LINNEAEUS, 1758) (TREMATODA: FASCIOLIDAE), causadas por *Euphorbia splendens* var. *hilopii* N.E.B. **Parasitología al día**, v. 22, p.105-7, 1998.

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

PINAUD, S.; PORTELA, J.; DUVAL, D.; NOWACKI, F. C.; OLIVE, M.; ALLIENNE, J.; GALINIER, R.; DHEILLY, N. M.; KIEFFER-JAQUINOD, S.; MITTA, G.; THÉRON, A.; GOURBAL, B. A shift from cellular to humoral responses contributes to innate immune memory in the vector snail *Biomphalaria glabrata*. **PLoS Pathog**, v. 12, p. 1- 18, 2016.

RATCLIFFE, N. A. A primer for the now specialist (review). **Immul Lett**, v. 10, p. 253-70, 1985.

RICHARDS, C. S. & RENWRANTZ, L. R. Two lectins on the surface of *Helix pomatia* haemocytes: a Ca²⁺ dependent, GalNac-specific lectin and a Ca²⁺ independent, mannose 6-phosphate-specific lectin which recognizes activated homologous opsonins. **J Comp Physiol**, v. 161, p. 43, 1991.

ROFATTO, H. K.; LEITE, L. C. C.; TARARAM, C. A.; KANNO, A. I.; MONTAYA, L. P. F. Antígenos vacinais contra esquistossomose mansônica: passado e presente. **Rev Biol**, v. 6b, 54-9, 2011.

SCHALL, V. T. & DINIZ, M. C. P. Information and education in Schistosomiasis control: an analysis of the situation the State of Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 35-43, 2001.

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

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* latex. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 34, p. 183-191, 1992.

SCHALL, V. T.; 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* latex. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 34, p. 183-191, 2001.

SANTHANAGOPALAN, V. & YOSHINO, T. Monoamines and their metabolites in the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*. **Comp Biochem Physiol Part A** v. 125 p. 469-78, 2000.

SINGH, S. & SINGH, D. K. Effect of different combinations of MGK-264 or Piperonyl Butoxide with plant-derived molluscicides on snail reproduction. **Arch Environ Contam Toxicol**, v. 38, p. 182-90, 2000.

SORIA, G. P.; LOURENÇO, M. I.; REY, L. Controle de populações de *Bulinus globosus* transmissores da esquistossomose em Moçambique com moluscicida vegetal. **Rev Med Moçambique**, v. 2, p. 75-79, 1982.

SOUZA, C. A.; DE CARVALHO, R. R.; KURIYAMA, S. N.; ARAÚJO, I. B.; RODRIGUES, R. P.; VOLLMER, R. S.; ALVES, E. M.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Study of the embriofeto-toxixity of “Crown of Thorns” (*Euphorbia milii* var. *hislopii*) latex, a natural molluscicide. **Braz J Med Biol Res**, v. 30, p. 1325-32, 1997.

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

SOUZA, S. S. & ANDRADE, Z. A. On the origin of the *Biomphalaria glabrata* hemocytes. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 213-8, 2006.

SOUZA, S. S. & ANDRADE, Z. A. The significance of the amoebocyte-producing organ in *Biomphalaria glabrata*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 5, p. 598-603, 2012.

TIERNEY, A. J. Structure and function of invertebrate 5-HT receptors: a review. **Comp Biochem Physiol A**, v. 128, p. 791-804, 2001.

TORGERSEN, K. M.; VANG, T.; ABRAHAMSEN, H.; YAGUB, S.; TASKÉN, K. Molecular mechanisms for protein kinase A-mediated modulation of immune function. **Cell Signal**, v. 14, p.1-9, 2002.

TOLOSA, E. M. C; RODRIGUES, C. J.; BEHMER, O. A.; NETO, A. G. F. **Manual de técnicas para histologia**. Normal e Patológica. 2ª ed. Barueri: São Paulo, 2003. 331 p.

VALANNE, S.; WANG, J. H.; RAMET, M.; The Drosophila Toll signaling pathway. **J Immunol**, v. 186, p. 649-56, 2011.

VASCONCELLOS, M. C. & AMORIN, A. Molluscicidal action of the latex of *Euphorbia splendens* var. *hilopii* N.E.B. (“Crist’s Crown”) (Euphorbiaceae) against *Lymnaea columella*

(Say, 1817) (Pulmonata: Lymnaeidae), intermediate host of *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 (Trematoda: Fasciolidae). **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, p. 557-563, 2003.

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. 475-6, 1986.

VAN DER KNAAP, W. P. W. & LOKER, E. S. Immune mechanisms in trematode-snail interactions. **Parasitol Today**, v. 6, p. 175-82, 1990.

VARGAS-ALBORES, F. & BARRACCO, M. A. Mecanismos de defensa de los moluscos bivalvos, con énfasis em pectínidos. **Los moluscos pectínidos de Iberoamérica: Ciência y Acuicultura**. Cap. 7, p. 127-46, 2001.

VIEIRA, S. **Introdução à Bioestatística**. Elsevier. 5 ed. 2016.

VINCENDEAU, P.; GOBERT, A. P.; DAULOUÈDE, S.; MOYNET, D.; MOSSALAYI, M. D. Arginases in parasitic diseases. **Trends Parasitol**, v. 19, p. 9-12, 2003.

WAGGE, L. E. Amoebocytes. **Int Rev Cytol**, v. 4, p. 31-78, 1955.

WHITTEN, M. M.; MELLO, C. B.; GOMES, S. A.; NIGAM, Y.; AZAMBUJA, P.; GARCIA, E. S.; RATCLIFFE, N. A. Papel do superóxido e nitrogênio reativos intermediários em *Rhodnius prolixus* (Reduviidae) / *Trypanosoma rangeli* interações. **Exp Parasitol**, v.98, p. 44-57, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Reducing Risks, Promoting Healthy Life**. Geneva: World Health Organization. 2002.

YASURAOKA, J.; HASHIGUCHI, J.; BLAS, B. S. Laboratory assessment of the molluscicidal activity of the plant *Jatropha curcas* against *Oncomelania* snails. In: **Proceedings of the Philippine-Japan Joint Conference on Schistosomiasis Research and Control**, v. 110, Manila: Japan International Cooperation Agency, 1979.

YOSHINO, T. P. Encapsulation response of the marine prosobranch *Cerithidea californica* to natural infections of *Renicola buchanaani* sporocysts (Trematoda:Renicolidae). **Int J Parasitol**, v. 6, p. 423-31, 1976.

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

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

ZAHOOR, Z.; DAVIES, A. J.; KIRK, R. S.; ROLLINSON, D.; WALKER, A. J. Nitric oxide production by *Biomphalaria glabrata* haemocytes: effects of *Schistosoma mansoni* ESPs and regulation through the extracellular signal-regulated kinase pathway. **Parasit Vectors**, v. 2, p. 1-10, 2009.

ZELCK, U. E.; BECKER, W.; BAYNE, C. J. The plasma proteins of *Biomphalaria glabrata* in the presence and absence of *Schistosoma mansoni*. **Dev Comp Immunol**, 181-94, 1995.