



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
MESTRADO EM PATOLOGIA**

NATÁLIA MORAIS DE ANDRADE

SISTEMA PIGMENTAR EXTRATEGUMENTAR DE *Biomphalaria glabrata* (SAY, 1818) INFECTADA E NÃO INFECTADA PELO *Schistosoma mansoni* (SAMBON, 1907) E AS ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS OCORRIDAS PÓS-INFECÇÃO.

**FORTALEZA
2009**

NATÁLIA MORAIS DE ANDRADE

SISTEMA PIGMENTAR EXTRATEGUMENTAR DE *Biomphalaria glabrata* (SAY, 1818) INFECTADA E NÃO INFECTADA PELO *Schistosoma mansoni* (SAMBON, 1907) E AS ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS OCORRIDAS PÓS-INFECÇÃO.

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em patologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Schemelzer de Moraes Bezerra

Co-orientador: Prof. Dr. Roberto Wagner Bezerra de Araújo

**FORTALEZA
2009**

A568s Andrade, Natália Morais de

Sistema pigmentar extrategumentar de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) infectada e não infectada pelo schistosoma mansoni (Sambon, 1907) e as alterações histológicas ocorridas pós-infecção./ Natália Morais de Andrade. – Fortaleza, 2009.

84 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Schemelzer de Moraes Bezerra

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Programa de Pós-Graduação em Patologia, Fortaleza-Ce, 2009.

1. *Schistosoma mansoni*. 2. *Biomphalaria*. 3. Infecção. I. Bezerra, Fernando Schemelzer de Moraes (Orient.) II. Título.

CDD: T616.963

NATÁLIA MORAIS DE ANDRADE

SISTEMA PIGMENTAR EXTRATEGUMENTAR DE *Biomphalaria glabrata* (SAY, 1818) INFECTADA E NÃO INFECTADA PELO *Schistosoma mansoni* (SAMBON, 1907) E AS ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS OCORRIDAS PÓS-INFECÇÃO.

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Patologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Patologia.

Aprovada em ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fernando Schemelzer de Moraes Bezerra (Orientador)
Universidade Federal do Ceará- UFC

Prof(a). Dra. Maria Jânia Teixeira
Universidade Federal do Ceará- UFC

Prof. Dr. Paulo Roberto Carvalho de Almeida
Universidade Federal do Ceará- UFC

Prof(a). Dr(a). Maria de Fátima de Oliveira
Universidade Federal do Ceará- UFC

“Um homem que nunca muda de opinião, em vez de demonstrar a qualidade da sua opinião demonstra a pouca qualidade da sua mente”.

Marcel Achard

Aos meus pais, Maxwell e Socorro,
e ao meu esposo André por todo incentivo
e amor dedicados a mim durante essa trajetória.

AGRADECIMENTOS

Á Deus, por me guiar durante toda a caminhada;

Ao meu marido, André, pelo amor e companheirismo, pelas palavras de carinho nas horas difíceis, pelos sorrisos compartilhados a cada conquista, pela presença sempre constante ao meu lado durante os dois anos de curso;

Aos meus pais, Maxwell e Socorro, por estarem presentes em todos os momentos e por apoiarem a realização de mais uma etapa da minha vida;

Aos meus irmãos, Hugo e Laís, e a minha sobrinha, Maria Luisa, por tornarem os meus dias mais felizes;

A Tia Sílvia, Tio Ney, Larissa e Karine, minha família cearense, que tão bem me acolheu;

Aos meus amigos do Laboratório de Pesquisa em Parasitologia e Biologia de Moluscos (LPPBM) em nome de Teiliane, Marta e Vanessa e aos que por lá já passaram, Jamile, Luana e David;

Aos meus amigos de Natal-RN, Maísa, Crys, Maria Helena, Verusk, Míria e Maíra que apesar da distância sempre estiveram presentes no coração;

Aos meus amigos cearenses, Juliana, Virgínia, Antônio Carlos, André Reis e Leopoldo que sempre me incentivaram e estiveram ao meu lado;

Ao professor Fernando Schemelzer, meu orientador, que me ajudou durante todo o desenvolvimento do trabalho;

Ao professor Roberto Wagner, pela colaboração na co-orientação desse trabalho;

Ao meu amigo Coelho que tanto me ensinou na rotina laboratorial;

Ao Dr. Henrique Lenzi, um professor e amigo, que além de imprescindível na conclusão deste trabalho, muito me ensinou sobre a importância de ser feliz;

A Lângia Montresor, uma amiga indispensável nos meus conhecimentos sobre histologia e essencial nos resultados desse trabalho;

À todos do Departamento de Patologia da FioCruz/RJ, responsáveis pela conclusão dos resultados deste trabalho em nome de Marcelo Pelajo Machado, chefe do Departamento de Patologia do IOC;

À todos do Departamento de Patologia e Medicina Legal (DPML), em especial a Paula e Marli e a D. Neném;

A todos os professores do Curso de Mestrado em Patologia;

A todos os meus colegas de curso, Mércia, Camila, Liliane, Sâmia, Paulo e Ronaldo;

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

RESUMO

A esquistossomose é uma endemia parasitária típica das Américas, Ásia e África consistindo em um grave problema de saúde pública. A manutenção do ciclo vital do *Schistosoma mansoni* em seus hospedeiros intermediários depende, entre outros fatores, dos seus mecanismos de defesa que é realizada pelos hemócitos juntamente com as células pigmentares reticulares e os metais, presentes na hemolinfa do molusco. Nesse estudo, buscou-se descrever o sistema pigmentar extrategumentar de *Biomphalaria glabrata* infectada e não infectada pelo *S. mansoni* e as alterações histológicas ocorridas pós-infecção. Foram infectados 44 moluscos sendo estes retirados para análise histológica a cada dez dias pós-infecção resultando em uma análise no 10º, 20º e 30º dias. Após os procedimentos de fixação, os exemplares foram cortados e corados por nove colorações para observação histológica em microscópio óptico e confocal. Para o controle foram utilizados 50 exemplares de moluscos não-infectados. Duas categorias celulares foram encontradas tanto no grupo controle quanto nos três grupos de moluscos infectados. Uma categoria foi formada pelas células dendríticas pigmentares pequenas e apareceu, predominantemente, no músculo não havendo diferença em relação a quantidade e ao tamanho quando comparado os grupos controle e infectado. A segunda categoria foi formada pelas células reticulares pigmentares que mostraram uma distribuição ampla por todo o corpo do molusco. Essa categoria apresentou diferença tanto em quantidade quanto em tamanho quando comparado ao grupo controle e aos grupos infectados. As formas evolutivas foram observadas nos grupos com 20 e 30 dias de infecção enquanto que as reações granulomatosas foram encontradas tanto nos três períodos de análise pós-infecção quanto no grupo controle. A relação entre molusco e parasito é essencial para o entendimento da biologia do parasito nos seus hospedeiros intermediários e para o desenvolvimento de métodos para o controle de moluscos em áreas endêmicas. Apesar de muitos trabalhos relatando a relação parasito-hospedeiro em *S. mansoni*, o aparecimento de células pigmentares ainda não tinha sido relatado em invertebrados, assim, a confirmação da presença dessas células se torna importante na elucidação do papel destas na relação parasito-hospedeiro.

Palavras-chave: *Schistosoma mansoni* - *Biomphalaria* - Infecção

ABSTRACT

Schistosomiasis is an endemic parasitic disease typical of the Americas, Asia and Africa consisting of a major public health problem. The maintenance of the life cycle of *Schistosoma mansoni* in their intermediate hosts depends, among other factors, the mechanisms of defense which is performed by hemocytes with reticular pigmentary cells and metals present in the hemolymph of the snail. In this study, we sought to describe the extracutaneous pigment system of *B. glabrata* infected and not infected with *S. mansoni* and histological changes occurring post-infection. 44 were infected snails were put out for histological analysis every ten days post-infection resulting in an analysis in 10, 20 and 30 days. After fixation procedures, the specimens were cut and stained by nine stains for histological observation under a light microscope and confocal. For control we used 50 specimens of non-infected snails. Two categories phones were found in both the control and the three groups of infected snails. One group was formed by small pigmented dendritic cells and appeared predominantly in muscle with no difference regarding the amount and size when compared to the control group and infected. The second category was formed by reticular pigment cells that showed a wide distribution throughout the body of the snail. This category was different both in quantity and size when compared to the control and infected groups. The developmental stages were observed in groups of 20 and 30 days of infection while the granulomatous reactions were found either in the three study periods after infection and control groups. The relationship between snail and parasite is essential for understanding the biology of the parasite in its intermediate hosts and the development of methods to control snails in endemic areas. Although many studies about the host-parasite relationship in *S. mansoni*, the appearance of pigment cells had not yet been reported in invertebrates, thus confirming the presence of these cells becomes important in the elucidation of their role in host-parasite relationship.

Keywords: *Schistosoma mansoni* – *Biomphalaria* – Infection

LISTA DE FIGURAS

1. Áreas endêmicas e focais da Esquistossomose mansônica no Brasil, no ano de 2002.	16
2. Ciclo evolutivo do <i>Schistosoma mansoni</i>	19
3. Espécies e subespécies de <i>Biomphalaria</i> descritas no Brasil	22
4. Cladograma representando a evolução filogenética de acordo com a formação corporal	25
5. Moluscos <i>Biomphalaria glabrata</i> expostos ao miracídio de <i>Schistosoma mansoni</i> ...	36
6. Etapas do processo de separação da parte mole e concha	38
7. Corte histológico da região cefalopodal de <i>Biomphalaria glabrata</i> não infectado ...	41
8. Corte histológico da região da crista renal não infectado.....	42
9. Presença de células reticulares pigmentares na região da crista renal de molusco não infectado	42
10. Formação de granulomas bacterianos na região cefalopodal de moluscos não infectados	43
11. Distribuição das células reticulares na região cefalopodal de moluscos infectados ...	44
12. Células reticulares na crista renal de molusco infectado	45
13. Região do manto com presença de células reticulares e granuloma bacteriano	45
14. Região cefalopodal com granulomas bacterianos e células dendríticas de molusco com 10 dias de infecção.....	46
15. Presença de granuloma na região do colar do manto em molusco com 10 dias de infecção.....	47
16. Presença de granulomas e células reticulares na região da crista renal de molusco com 10 dias de infecção	47
17. Presenças de células dendríticas na região cefalopodal de molusco com 10 dias de infecção	48
18. Células reticulares na cavidade do manto de molusco não infectado e com 10 dias de infecção	49
19. Células reticulares na região da crista renal em molusco com 10 dias de infecção	50
20. Células reticulares na crista renal em molusco com 10 e 20 dias de infecção	51

21. Células reticulares em conexão com células subepitelióides na região da crista renal de molusco com 20 dias de infecção	52
22. Sítio de proliferação de hemócitos na região renal de molusco com 20 dias de infecção.....	52
23. Esporocistos-filhos e células reticulares na crista renal de molusco com 20 dias de infecção.....	53
24. Esporocisto-filho na cavidade do manto em molusco com 20 dias de infecção	54
25. Esporocisto-filho em processo de diferenciação em cercária	54
26. Granuloma bacteriano na região da crista renal em molusco com 20 dias de infecção	55
27. Granuloma localizado no hepatopâncreas em molusco com 20 dias de infecção	56
28. Células reticulares na crista renal em moluscos com 20 e 30 dias de infecção	57
29. Esporocisto-filho na região da crista renal em molusco com 30 dias de infecção	58
30. Esporocisto-filho em processo de diferenciação em molusco com 30 dias de infecção	58
31. Esporocisto-filho em processo de diferenciação em molusco com 30 dias de infecção	59
32. Esporocisto-filho em processo de diferenciação em molusco com 30 dias de infecção	59
33. Células reticulares na crista renal corados por PERL'S em molusco com 10 dias de infecção	61
34. Presença de pigmento melânico e férrico nas células reticulares de molusco com 20 dias de infecção	62
35. Diminuição do número de células reticulares na crista renal em molusco com 30 dias de infecção	63
36. Esporocisto-mãe em diferenciação	63
37. Bactérias no interior do granuloma	64
38. Bactérias no interior do granuloma.....	65
39. Granuloma com bactéria e esporocisto em seu interior	65

40. Região da crista renal corada com PMA Picro-sirius	66
41. Estrutura granulomatosa sem a presença de colágeno corada com PMA Picro-sirius..	67
42. Presença de granulomas em animais infectados nos três períodos analisados	69
43. Presença de formas evolutivas em animais infectados nos três períodos analisados...	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BH	Belo Horizonte
CENEPI	Centro Nacional de Epidemiologia
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa Animal
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DACT	Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
FAMED	Faculdade de Medicina
FUNASA	Fundação Nacional da Saúde
HE	Hematoxilina-Eosina
LPPBM	Laboratório de Pesquisa em Parasitologia e Biologia de Moluscos
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAS	Ácido Periódico de Schiff

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	A Esquistossomose	14
1.1.1	Breve histórico e Epidemiologia	14
1.1.2	A doença	16
1.1.3	Ciclo evolutivo	17
1.2	O Parasito	19
1.3	O Molusco – hospedeiro intermediário	20
1.4	Posição dos moluscos na evolução filogenética	23
1.5	Sistema de defesa celular dos moluscos	26
1.6	Evolução do <i>Schistosoma mansoni</i> no hospedeiro intermediário	29
1.7	Sistema de Células Pigmentares	31
2	OBJETIVOS	33
2.1	Objetivo Geral	33
2.2	Objetivos Específicos	33
3	MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1	Moluscos	34
3.2	Parasito	34
3.3	Camundongos	34
3.4	Infecção dos Moluscos	35
3.5	Retirada da parte mole do molusco	37
3.6	Corte e Análise Histológica dos Moluscos	38
3.7	Documentação dos Achados Histológicos	39
3.8	Aspectos Éticos da pesquisa	39
4	RESULTADOS	40
4.1	Sistema Pigmentar extrategumentar de <i>Biomphalaria glabrata</i> não infectada	41
4.2	Sistema Pigmentar extrategumentar de <i>Biomphalaria glabrata</i> Infectada..	43
4.3	Alterações histopatológicas pós-infecção	46
4.3.1	Análises em moluscos com 10 dias de infecção	46
4.3.2	Análises em moluscos com 20 dias de infecção	50
4.3.3	Análises em moluscos com 30 dias de infecção	56
4.4	Colorações especiais	60
4.4.1	Coloração de PERL'S	60
4.4.2	Coloração de Giemsa	64
4.4.3	Coloração de PMA Picro-sirius	66
4.4.4	Demais colorações	68
4.5	Alterações patológicas nos três períodos analisados	68
4.5.1	Granulomas	68
4.5.2	Formas evolutivas	69
5	DISCUSSÃO	71
6	CONCLUSÃO	76
	REFERÊNCIAS	77
	ANEXOS	85

1 INTRODUÇÃO

1.1 A ESQUISTOSSOMOSE

1.1.1 Breve histórico e epidemiologia

A primeira observação sobre um trematódeo de sexos separados, introduzido no sistema helmintológico, foi feita por Theodore Bilharz em 1851 no Cairo onde recebeu o nome de *Distomun haematobium*, por possuir duas ventosas e pelo habitat sanguíneo e a doença recebeu o nome de distomíase. Posteriormente, Von Siebold e Meckel Von Hemsbach propuseram a denominação Bilharzia. Por fim, prevaleceu o nome genérico de origem grega *Schistosoma*, sugerido por Weinland, em 1858, devido à fenda no corpo do verme macho onde se aloja a fêmea (PRATA, 2008).

A esquistossomose originou-se na África e na Ásia e dispersou-se pelos outros continentes através de grandes fluxos migratórios. Para as Américas, o tráfico de escravos foi o fator responsável pela disseminação da doença (PASSOS; AMARAL, 1998). No ano de 1902 a esquistossomose foi assinalada por Mauren em Antigua; em 1903 por Letulle em Martinica e em 1904 por Gonzalez-Martinez em Porto Rico (PRATA, 2008).

Essa parasitose ocorre em todos os países do mundo em desenvolvimento, sendo mais prevalente entre as comunidades pobres das zonas rurais e peri-urbanas. O primeiro relato sobre a presença de pacientes com esquistossomose no Brasil foi publicado em 27 de julho de 1908, na Revista Científica Brasil Médico, em um artigo publicado por Manuel Augusto Pirajá da Silva. Já na década de 1920, as observações de Heraldo Maciel, realizadas em marinheiros, revelaram a rapidez com que a endemia havia se alastrado. Porém, a quantificação do problema somente ocorreu em 1950, com o inquérito coprológico nacional em escolares, realizado na Divisão de Organização Sanitária, por Pellon e Teixeira. Calculou-se que na época, já havia cerca de dois milhões e meio de exames de fezes positivos para ovos de *S. mansoni* no Brasil. Para 1960, a estimativa era de, pelo menos, seis milhões de esquistossomóticos no país (KATZ; PEIXOTO, 2000; PRATA, 2008).

A esquistossomose é uma endemia parasitária típica das Américas, Ásia e África, consistindo em um grave problema de saúde pública. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que a esquistossomose acomete 200 milhões de pessoas em 75 países (MOTT, 1987; PASSOS; AMARAL, 1998; OMS, 2008). Entre os fatores que contribuíram para a propagação da esquistossomose estão os movimentos migratórios, a exploração inadequada de

recursos hídricos, a distribuição ampla e a susceptibilidade dos hospedeiros intermediários, a longevidade da doença e a falta de educação sanitária (RIBEIRO *et al.*, 2004; ZUIM *et al.*, 2005). Embora a mortalidade associada seja relativamente baixa, ela causa danos permanentes aos órgãos mais atingidos, anemia, atraso no crescimento físico, comprometimento do desenvolvimento cognitivo e da aprendizagem (OMS, 2006).

No Brasil, a estimativa de prevalência é de 6 milhões de indivíduos infectados e, aproximadamente, 30 milhões de pessoas vivendo em áreas de transmissão da doença, com 60 a 80% morando na região nordeste. É a segunda causa de morbidade entre as doenças tropicais ficando atrás apenas da malária (FERRARI *et al.*, 2003; RIBEIRO *et al.*, 2004; OMS, 2008). Consiste em uma doença crônica que pode evoluir para complicações graves levando, eventualmente, a óbito, em função de extensa fibrose decorrente da presença de ovos de *S. mansoni* no parênquima hepático (PASSOS; AMARAL, 1998). Sua forma intestinal é difícil de avaliar diante dos sintomas digestivos inespecíficos serem semelhantes aos de outras patologias, especialmente parasitos intestinais, uma condição comum em áreas endêmicas (NOYA *et al.*, 2006).

No Brasil, esta doença provavelmente foi introduzida através dos portos de Salvador e do Recife. O clima de país tropical tem permitido, na maioria dos Estados brasileiros, as condições necessárias para a transmissão da doença (NEVES, 2005). Em alguns estados brasileiros, a esquistossomose caracteriza-se como uma doença de pouca gravidade com manifestações clínicas vagas e pouco específicas, devido à baixa carga parasitária na maioria dos indivíduos infectados. Esta característica, além de impor limitações ao diagnóstico clínico e parasitológico da doença, dificulta seu controle e erradicação, fazendo com que as populações infectadas ou sob risco de infecção não se preocupem com sua ocorrência e com as suas possíveis conseqüências a médio e longo prazo (KANAMURA; DIAS, 2001). A figura 1 mostra a distribuição da esquistossomose de acordo com a prevalência.

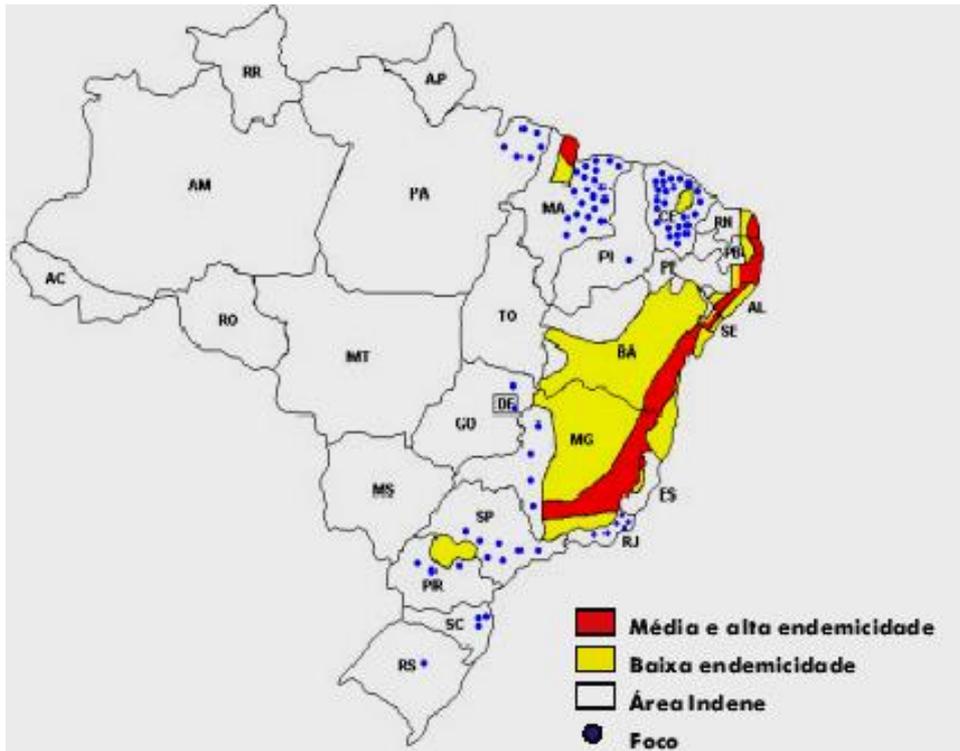


Figura 1- Áreas endêmicas e focais da Esquistossomose mansoni no Brasil, ano 2002.

Fonte: GT esquistossomose CGVEP/CDTV/CENEPI/FUNASA/MS.

1.1.2 A Doença

A infecção humana pelo *S. mansoni* induz diferentes manifestações clínicas características. Estudos anatomo-clínicos mostram que existem diferenças significativas entre indivíduos portadores das várias formas clínicas da esquistossomose mansônica nas fases aguda e crônica (BARROS-COELHO, 1955; BOGLIOLO, 1959).

A duração da fase aguda ocorre entre 40 e 60 dias quando começam a aparecer os primeiros ovos nas fezes, evidenciando a maturação dos parasitos e o quadro febril declina lentamente. O paciente passa, então, para a fase crônica com diarreias, evacuações mucosanguinolentas e cólicas abdominais. Em casos mais graves, devido à fibrose extensa do fígado, ocorre hipertensão da circulação portal, acúmulo de sangue no baço e aparecimento de varizes no esôfago, órgãos cujas veias desembocam no sistema porta. A ruptura das varizes esofágicas provoca hemorragias extensas (hematêmese) e muito graves. A desnutrição dos pacientes é devido não somente a anemia decorrente das hemorragias, mas também ao

funcionamento insuficiente do fígado. A cura exige medicamentos específicos (BOROS, 1989).

Dependendo da intensidade da infecção e da resistência da pessoa infectada, os efeitos dos pequenos danos internos podem passar despercebidos. Por outro lado, em outros indivíduos mais fortemente infectados haverá, pelo menos, uma queda no seu rendimento físico. Já em crianças pode haver perda de crescimento. Em situações mais extremas, a formação de granulomas provoca o rompimento de vasos acima do estômago, implicando em intensas hemorragias pela boca que podem levar o indivíduo à morte. (FEACHEM *et al.*, 1983).

1.1. 3 Ciclo evolutivo

Indivíduos infectados com *S. mansoni* liberam em suas fezes ovos do parasito que, em contato com a água eclodem e liberam o miracídio, a forma evolutiva infectante para o molusco hospedeiro. O miracídio é um organismo muito móvel quando em meio aquático, graças aos numerosos cílios que lhe revestem a delgada cutícula e ao seu sistema muscular. Alguns autores sugerem que existe uma atração miracidiana com relação aos moluscos decorrente da detecção, pelo miracídio, de substâncias, chamadas de miraxone, que seriam produzidas pelos moluscos e que se difundiriam pelo meio aquático, sendo detectadas através das terminações sensoriais da papila apical ou terebratorium (COELHO, 1970; NEVES, 2005).

A ação combinada dos movimentos do miracídio e da ação enzimática constitui o elemento que permite a introdução do miracídio nos tecidos do molusco. O local de penetração pode ser representado por qualquer ponto das partes expostas do molusco, sendo, porém, a base das antenas e o pé os pontos preferidos. Decorrido 48 horas após penetrar no interior do molusco hospedeiro intermediário, o miracídio perde a mobilidade e se transforma num esporocisto primário, a primeira forma evolutiva dentro do molusco, contendo de 50 a 100 células germinativas. Cada um destes dará origem a quatro esporocistos secundários, a segunda forma evolutiva intramolusco, e este, por um processo de reprodução assexuada, darão origem a milhares de cercárias, a terceira forma evolutiva dentro do molusco (COELHO, 1970; NEVES, 2005).

Finalmente, após quatro a sete semanas da infecção do molusco, este começa a liberar as cercárias. É sob a forma de cercárias, que são atraídas por moléculas de lipídeos presentes no tegumento dos vertebrados, que o *S. mansoni* infecta o hospedeiro definitivo, penetrando ativamente na pele e/ou mucosa do homem, por meio de ação combinada da secreção lítica das glândulas anteriores e dos movimentos vibratórios intensos (COELHO, 1970; NEVES, 2005).

Uma vez nos tecidos do hospedeiro definitivo, as cercárias atingem a circulação linfática e venosa transformando-se em esquistossômulos e migram até o coração e os pulmões, retornando posteriormente ao coração, de onde se deslocam através das artérias aos pontos mais diversos do organismo. O fígado se constitui o órgão preferencial de localização do parasito, onde estas formas jovens se diferenciam sexualmente e crescem, alimentando-se de sangue. Ainda imaturos, os parasitos migram para a veia porta onde completam a maturação. A partir da terceira semana de infecção ocorre à migração dos vermes acasalados para as veias mesentéricas (COELHO, 1970; NEVES, 2005).

Os vermes adultos se localizam nos ramos terminais dessas veias onde acontece o início da postura. Os ovos, imaturos, migram da luz do vaso para a luz intestinal, provocando assim micro hemorragias e áreas de inflamação responsáveis pelo aparecimento das diarréias muco-sanguinolentas e outros distúrbios gastrointestinais. Uma fêmea de *S. mansoni* produz cerca de 300 ovos diários, dos quais apenas 25 a 35% são eliminados pelas fezes. Os ovos que não conseguem atingir a luz intestinal por ficarem retidos na submucosa dos tecidos, ou porque foram depositados em vasos de outros órgãos, como o fígado, bem como aqueles que refluem para o parênquima hepático são os responsáveis pela formação dos microgranulomas que poderão obstruir, total ou parcialmente, o fluxo sanguíneo, ocasionando toda a sintomatologia da doença em suas formas mais graves. Durante o processo de migração dos ovos (cerca de uma semana), ocorre a maturação deles e organiza-se em seu interior o embrião que é denominado miracídio, iniciando um novo ciclo (COELHO, 1970; NEVES, 2005) (Fig. 2).

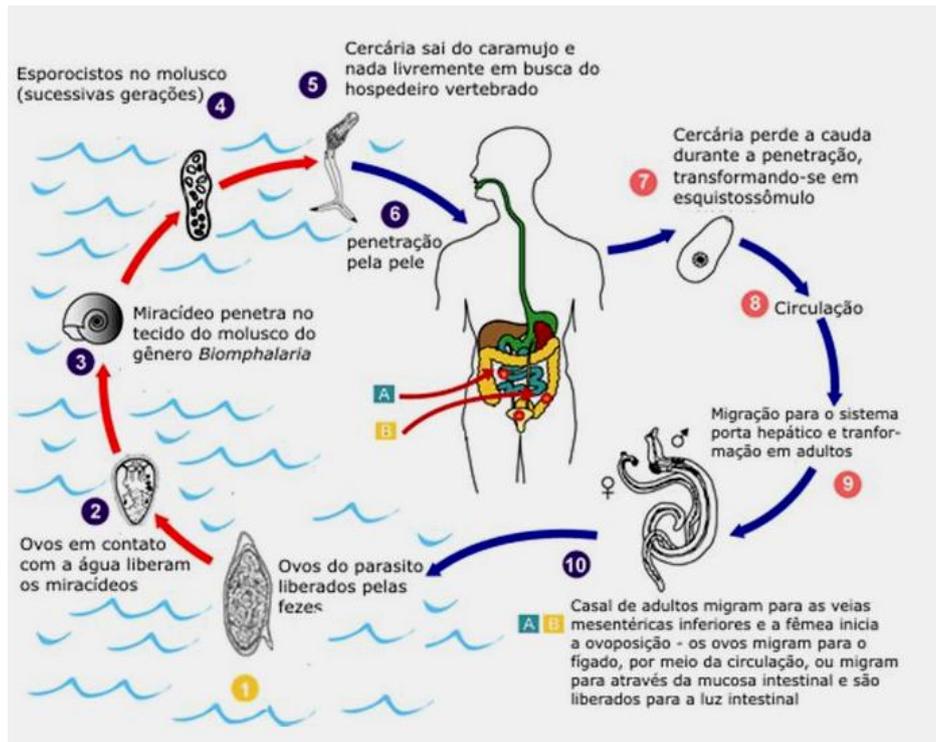


Figura 2 - Ciclo evolutivo do *Schistosoma mansoni*

Fonte: http://www.fcfrp.usp.br/dactb/Parasitologia/Arquivos/Genero_Schistosoma_arquivos/image024.jpg

1.2. O PARASITO

Os trematódeos Digenea apresentam os mais complexos ciclos biológicos do reino animal. Estes parasitos heteroxênicos requerem como regra geral, a presença de um molusco, principalmente Gastropoda, como primeiro hospedeiro intermediário.

O fenômeno de adaptabilidade dos trematódeos da sub-classe Digenea aos seus primeiros hospedeiros intermediários apresenta, de uma maneira geral, alta especificidade. Verifica-se que na maioria das espécies de parasitos desta sub-classe, o primeiro hospedeiro intermediário se situa num único gênero ou se acha restrito a uma única espécie de molusco, ou mesmo a determinadas linhagens geográficas desta espécie. Este fato foi comprovado por estudos realizados com *Biomphalaria glabrata* de Belo Horizonte, MG, que se apresentou susceptível ao *S. mansoni* local, porém altamente resistente à infecção por *S. mansoni* de São José dos Campos, SP (ZUIM *et al.*, 2005).

Entre centenas de espécies da subclasse Digenea que parasitam inúmeras espécies de vertebrados estão às espécies do gênero *Schistosoma*. Destas, três são de maior importância para a saúde: *S. mansoni*, *S. japonicum* e *S. haematobium* (MOTT, 1987).

O *S. haematobium*, agente da esquistossomose vesical ou “hematúria do Egito”, é transmitido em grande parte da África, Oriente próximo e médio e tem como hospedeiros intermediários principalmente, moluscos pertencentes ao gênero *Bulinus* parasitando vasos do plexo vesical sendo os ovos eliminados pela urina (NEVES, 2005).

O *S. japonicum*, causador da esquistossomose japônica ou moléstia de Katayama, é transmitido na China, Japão, Ilhas Filipinas e sudeste asiático, é responsável pela esquistossomose intestinal e tem como hospedeiros intermediários moluscos do gênero *Oncomelani*. Essa espécie é mais frequentemente encontrada parasitando o sistema porta, mas pode parasitar vasos do plexo vesical (NEVES, 2005).

O *S. mansoni* é transmitido na África, seu continente de origem, em algumas ilhas do Caribe, América Central e do Sul, tendo como hospedeiros intermediários moluscos do gênero *Biomphalaria*. É encontrado parasitando vasos do sistema porta e os ovos são eliminados nas fezes (NEVES, 2005).

Na América do Sul encontramos transmissão do *S. mansoni* na Venezuela, no Suriname, em algumas ilhas do Caribe e principalmente no Brasil (KLOETZEL, 1989). Embora todas as espécies acima citadas tenham chegado ao Brasil, através de imigrantes de áreas endêmicas, somente o *S. mansoni* se instalou por ter encontrado aqui o hospedeiro intermediário adequado para o seu desenvolvimento (SILVEIRA, 1989).

Entender bem a fisiologia desse parasito e as distintas fases do seu desenvolvimento e ciclo de vida pode prover inestimáveis medidas para o desenvolvimento de novos métodos de controle da transmissão (OMS, 2008).

1.3. O Molusco - Hospedeiro intermediário

Segundo Bezerra (2005), os registros geológicos mais antigos para os moluscos da família *Plarnobidae*, comprovaram sua presença na Europa e nos Estados Unidos desde o período Jurássico, há cerca de 160 milhões de anos. Como as conchas do Jurássico não apresentam diferenças notáveis em comparação com as de períodos geológicos ulteriores ou da fauna moderna, a família deve ter existido em períodos geológicos mais antigos, pelo menos desde o Triássico, há 200 milhões de anos quando apenas despontavam os dinossauros, e 40 milhões de anos antes de aparecerem os primeiros traços de mamíferos. Desde então se extinguiram os dinossauros e inúmeras famílias de animais e vegetais, enquanto os

planorbídeos sobrevivem até hoje, ocupando as águas continentais de todo o planeta entre as latitudes 70 N e 40 S. Durante esses 200 milhões de anos resistiram às mais drásticas alterações ambientais, acumulando uma experiência evolucionária geradora de vasto repertório de estratégias de sobrevivência, que incluem as capacidades de autofecundação, estivação, hibernação, diapausa, enterramento no solo e altíssima prolificidade.

A classe Gastropoda apresenta grande interesse em termos de Parasitologia Humana e animal. Esta se divide em três subclasses, onde somente as subclasses Pulmonata e Prosobranchia possuem espécies que podem infectar o homem. A Pulmonata difere das demais por apresentar um saco pulmonar no lugar das brânquias, ausência de opérculo e coração com duas cavidades. Três ordens integram esta subclasse, sendo a Basommatophora a que contém os moluscos transmissores da esquistossomose nas Américas. Esta ordem é formada por moluscos dulcícolas, com um único par de tentáculos móveis não retráteis, e com olhos sésseis situados junto à base dos tentáculos. Das famílias que formam essa ordem está a família *Planorbidae*, onde é encontrado o gênero *Biomphalaria* (SOUZA; LIMA, 1990).

O gênero *Biomphalaria*, Preston, 1910 (Mollusca: Pulmonata, *Planorbidae*) possui 37 espécies já identificadas na África e na Região Neotropical e apresentam os hospedeiros intermediários para o parasito trematoda *S. mansoni*, agente causador da esquistossomose, na região neotropical e na África (PEPE *et al.*, 2006).

O gênero *Biomphalaria* apresenta concha do tipo discóide, com diâmetro variando de 7 a 40 mm, com uma zona central profunda, chamada umbigo, em ambos os lados da concha (Bis = duplo; Omphalos = umbigo). Apresenta a hemolinfa vermelha, devido a hemoglobina solúvel, e tubo renal em “J”. São hermafroditas podendo autofecundar-se, mas, preferencialmente, realizam fecundação cruzada, o que possibilita maior troca de material genético (VIANEY-LIAUD; DUSSART, 1994).

Dez espécies do gênero *Biomphalaria* já foram descritas no Brasil. São elas: *B. glabrata*, *B. tenagophila*, *B. straminea*, *B. amazonica*, *B. peregrina*, *B. occidentalis*, *B. intermedia*, *B. schrammi*, *B. oligoza* e *B. kuhniana* (PARAENSE, 1972). Destas, apenas as espécies *B. glabrata*, *B. tenagophila*, *B. straminea* foram encontradas naturalmente infectadas pelo *S. mansoni* sendo, portanto, as transmissoras da esquistossomose mansônica nas Américas (SOUZA; LIMA, 1990). *B. amazônica* e *B. peregrina* são consideradas hospedeiras intermediárias potenciais, tendo sido experimentalmente infectadas em condições de laboratório sem, contudo, apresentarem infecção por *S. mansoni* em condições naturais (Fig. 3).

Hospedeiras naturais	<i>Biomphalaria glabrata</i> (Say, 1818)
	<i>Biomphalaria tenagophila</i> (Orbigny, 1835)
	<i>Biomphalaria straminea</i> (Dunker, 1848)
Hospedeiras potenciais	<i>Biomphalaria amazonica</i> Paraense, 1966
	<i>Biomphalaria peregrina</i> (Orbigny, 1835)
Não hospedeiras	<i>Biomphalaria intermedia</i> (Paraense & Deslandes, 1962)
	<i>Biomphalaria kuhniana</i> (Clessin, 1883)
	<i>Biomphalaria schrammi</i> (Crosse, 1864)
	<i>Biomphalaria oligoza</i> Paraense, 1975
	<i>Biomphalaria occidentalis</i> Paraense, 1981
	<i>Biomphalaria tenagophila guaiabensis</i> Paraense, 1984

Figura 3 - Espécies e subespécie de *Biomphalaria* descritas no Brasil, assinalando as hospedeiras naturais, as potenciais e as não hospedeiras do *S. mansoni*.

Fonte: Vigilância e Controle de Moluscos de Importância Epidemiológica: Diretrizes Técnicas, 2008.

B. glabrata apresenta concha de até 40 mm de diâmetro por 11 mm de largura, seis a sete giros arredondados; periferia arredondada tendendo para a direita; é o maior molusco da família *Planorbidae*. É encontrado numa faixa contínua em todos os Estados brasileiros situados entre o Rio Grande do Norte e o Paraná, tendo sido descritos focos no Pará, Maranhão e Piauí. Constitui-se no mais eficaz vetor da esquistossomose, com taxas de positividade de até 70% (PARAENSE, 1972).

B. tenagophila apresenta concha com até 35 mm de diâmetro e 11 de largura, sete a oito giros com carena em ambos os lados, porém, mais acentuada a esquerda. Está mais restrita ao sul do país, entretanto, também é encontrada no oeste do Mato Grosso do Sul, sul da Bahia e leste do Rio de Janeiro até Rio Grande do Sul (SOUSA; LIMA, 1990).

B. straminea possui concha de até 16,5 mm de diâmetro e 6 mm de largura; cinco giros arredondados crescendo mais rapidamente, tendendo a aplanar-se. É encontrado em quase todas as bacias hidrográficas do Brasil. É a espécie predominante no nordeste do Brasil, principalmente na região do semi-árido, sendo a única das espécies transmissoras da esquistossomose encontrada no Estado do Ceará (PARAENSE, 1977).

1.4 Posição dos moluscos na evolução filogenética

O reino Animalia (Metazoa) são animais multicelulares. Compreendem um táxon monofilético contendo 34 filos. Mais ou menos 1,3 milhões de espécies são descritas. As espécies que possuem coluna vertebral são chamadas de vertebrados e constituem 5% dos animais. As espécies que não possuem são chamadas de invertebrados (BRUSCA; BRUSCA, 2003).

De acordo com a formação corporal, os Metazoa são divididos em organismos que não possuem tecido verdadeiro, os Mesozoa e pelos Parazoa e que possuem tecidos verdadeiros, os Eumetazoa que, por sua vez, são subdivididos em dois grupos: os diploblásticos que não possuem mesoderma verdadeiro, Radiatas, e os que são compostos pelo mesoderma, os Bilateria (BRUSCA; BRUSCA, 2003).

Os Eumetazoa são, ainda, divididos em três grupos. Os acelomados são seres que não possuem cavidade onde se localizam os órgãos. Já os celomados possuem uma verdadeira cavidade celômica que abriga os diversos órgãos do animal (BRUSCA; BRUSCA, 2003).

Os animais celomados são formados por dois grandes grupos, protostômios e deuterostômios, sendo os protostômios o grupo onde se encontram os moluscos (BRUSCA; BRUSCA, 2003).

Os membros do filo Mollusca estão entre os animais invertebrados mais evidentes e familiares e incluem os mariscos, as ostras, as lulas, os polvos e os caramujos. Em abundância de espécies, os moluscos constituem o maior filo de invertebrados além dos artrópodos. São descritas mais de 50.000 espécies vivas sendo encontradas no mar, na água doce e na terra. São distinguidos por um pé muscular, uma concha calcária (o manto) secretada pela parede corporal subjacente e um órgão de alimentação, a rádula. Apesar das diferenças existentes entre caramujos, lulas e mariscos, os moluscos são construídos no mesmo plano fundamental. Um molusco generalizado é um animal aquático que se move e se alimenta na superfície de um extrato duro. Seu corpo é bilateralmente simétrico. A superfície ventral é achatada e muscular formando uma sola rastejante ou pé. A superfície dorsal é coberta por uma concha oval, convexa e em forma de escudo que protege os órgãos internos adjacentes ou a massa visceral. A epiderme subjacente, o manto, secreta a concha do animal (BARNES; CALOU; OLIVER, 2007).

A evolução dos gastrópodos envolveu quatro alterações principais a partir da organização de um molusco generalizado: o desenvolvimento de uma cabeça; o alongamento

dorsoventral do corpo; a conversão da concha de um escudo a um abrigo protetor profundo e torção (BARNES; CALOU; OLIVER, 2007) (Fig. 4).

A subclasse Pulmonata contém os caracóis muito bem sucedidos, assim como muitas formas de água doce. Os primeiros moluscos pulmonados apareceram no Carbonífero, mas sua origem é obscura. Provavelmente eles evoluíram a partir de algum grupo de prosobrânquios operculados que tinham uma brânquia única. Essas formas ancestrais talvez habitassem os pântanos estuarinos e os brejos de areia, e a condição pulmonata poderia ter evoluído como um meio de troca gasosa quando os animais confinaram-se a pequenas poças estagnadas ou superfícies úmidas, mas expostas (BARNES; CALOU; OLIVER, 2007).

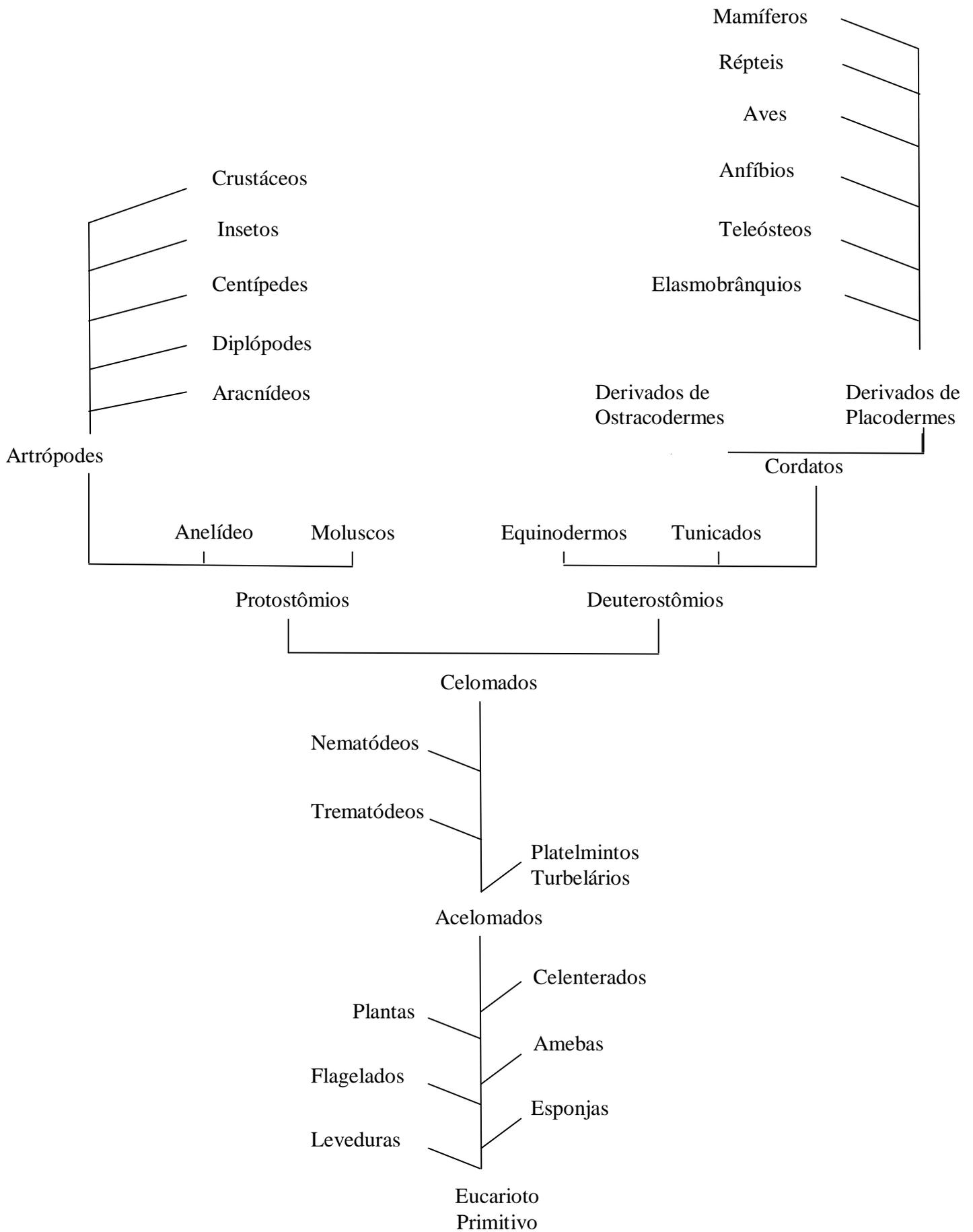


Fig. 4 - Cladograma representando a evolução filogenética de acordo com a formação corporal.

1.5 Sistema de defesa celular dos moluscos

Todos os animais metazoários são protegidos contra a invasão de organismos por um sistema interno de defesa. Esse sistema compreende diferentes elementos e consiste de várias células, tecidos e órgãos que são capazes de reagir contra patógenos potencialmente prejudiciais provenientes do meio ambiente externo (SMINIA; VAN DER KNAAP, 1986).

Mas os mecanismos de defesa mais especializados que constituem a imunidade adquirida só estão presentes nos vertebrados (ABBAS; LICHTMAN, 2005). No grupo dos protostômios, apenas os artrópodos possuem moléculas da família da proteína C-reativa e lectinas do tipo C que mostraram similaridades com as lectinas hepáticas dos vertebrados (MARCHALONIS; SCHLUTER, 1994).

A manutenção do ciclo vital do *S. mansoni* em seus hospedeiros intermediários sofre influências do ambiente natural onde ele ocorre, do comportamento biológico do miracídio e dos moluscos hospedeiros, dos mecanismos de defesa dos caramujos potencialmente transmissores e, também, dos mecanismos de adaptação do parasito aos seus hospedeiros intermediários (COELHO, 1995).

Entre os fatores endógenos envolvidos na interação parasito-molusco está o relacionado ao sistema de defesa dos gastrópodes. Este difere do sistema imune dos vertebrados devido à ausência de linfócitos, imunoglobulinas e resposta a antígeno específico, porém, mantém a capacidade de discriminar entre o “próprio” e o “não-próprio” (BAYNE, 1983).

O sistema de defesa dos moluscos é formado por elementos celulares e humorais. O componente celular do sistema de defesa é constituído por células chamadas de hemócitos (residentes ou teciduais e circulantes) e fagócitos fixos que são células que revestem os espaços do sangue; a imunidade humoral é mediada por lectinas e opsoninas que são proteínas sintetizadas pelos hemócitos, sendo que a primeira possui afinidade específica a carboidratos (SMINIA; VAN DER KNAAP, 1986; ZELCK; BECKER; BAYNE, 1995). A infecção do molusco pelo *S. mansoni*, ocorre pela penetração do miracídio. O molusco pode reagir a diferentes caminhos de penetração do miracídio de acordo com o seu grau de resistência/susceptibilidade (AZEVEDO; BORGES; ANDRADE, 2006).

Os fagócitos fixos ocorrem no tecido conjuntivo e dois tipos de células fixas estão presentes: as células reticulares e as células de poro. As células reticulares possuem numerosos processos citoplasmáticos que estão intimamente associados as fibras do tecido

conjuntivo. As células de poro possuem núcleo redondo, com nucléolo conspícuo e contém numerosos grânulos pretos. Elas estão engajadas na ingestão de proteínas próprias da hemolinfa (SMINIA; VAN DER KNAAP, 1986). A defesa inclui, portanto, processos de fagocitose, formação de granulomas, coagulação de hemolinfa e cicatrização.

Os hemócitos são macrófagos primitivos e constituem a principal linha de defesa contra agressões externas, podendo atuar em cooperação com outras células ou fatores humorais. Eles circulam livremente pela hemolinfa e podem se acumular em sítios específicos ao redor dos esporocistos formando estruturas granulomatosas focais. Foi demonstrado que hemócitos de caramujos resistentes são capazes de danificar o tegumento do miracídio e comprometer seriamente sua viabilidade. Estudos relatam que o aumento no número de hemócitos na circulação está intimamente ligado à infecção por *S. mansoni* (BORGES; SOUZA; ANDRADE, 1998; BORGES; AZEVEDO; ANDRADE, 2006).

Os caramujos susceptíveis podem mudar o comportamento reativo ao longo do curso da infecção, exibindo padrões de liberação de cercárias e figuras histopatológicas compatíveis com alta resistência (AZEVEDO; BORGES; ANDRADE, 2004). Em espécimes altamente resistentes de *B. glabrata*, os miracídios são logo reconhecidos, encapsulados e destruídos pelos hemócitos (BORGES; SOUZA; ANDRADE, 1998).

A proliferação dos hemócitos e a formação de lesões encapsulantes ao redor da larva são indicadores de caramujos resistentes (GODOY *et al.*, 1997). Alguns autores demonstraram o efeito da transferência do soro de *B. glabrata* resistente no aumento da capacidade fagocítica dos hemócitos de caramujos susceptíveis, demonstrando a interação entre fatores plasmáticos e hemócitos durante o processo de encapsulação e fagocitose, que ocorre algumas horas depois da penetração do miracídio (BAYNE; BUCKLEY; DEWAN, 1980).

O modelo *B. glabrata* / *S. mansoni* tem sido objeto de muitos estudos devido a susceptibilidade desse molusco, assim como a associação *B. tenagophila* (Taim) / *S. mansoni* apresenta-se como um modelo muito interessante porque mostra a resistência absoluta do molusco ao parasito (COELHO *et al.*, 2004). Foi demonstrado que após a transferência de soro de *B. tenagophila* resistente para um molusco susceptível ocorre um aumento na resistência ao *S. mansoni* nesse último. Assim, baseado nos resultados, acredita-se que a existência de fatores de transferência em *B. glabrata* resistente que ativam especificamente os hemócitos, também ocorre com *B. tenagophila* (COELHO; BEZERRA, 2006).

Os hemócitos apresentam heterogeneidade morfológica e bioquímica. Alguns são denominados “round cells” ou hialinócitos e têm núcleo grande para o tamanho do

citoplasma, pouca estrutura lisossomal e mostram pouca tendência a expandir-se *in vitro*, formar pseudópodes ou fagocitar partículas estranhas. Outros são chamados de granulócitos. Estes possuem, relativamente, mais citoplasma e lisossomos, formam pseudópodes e são ativos em fagocitose. Alguns autores acham que existem duas categorias de hemócitos distintas, enquanto outros acham que eles representam diferentes estádios de desenvolvimento de uma simples linhagem de células (MOORE; EBLE, 1977; VAN DER KNAAP; LOKER, 1990; BEZERRA *et al.*, 1997).

As evidências da susceptibilidade ou resistência à infecção ao *S. mansoni* presentes em diferentes espécies de moluscos *Biomphalaria* podem variar consideravelmente. As variedades podem ser observadas em moluscos de várias espécies de diferentes áreas geográficas. Trabalhos realizados mostraram que a *B. tenagophila* do vale do Rio Paraíba do Sul, SP, apresenta elevado grau de resistência à infecção por *S. mansoni* de Belo Horizonte, MG (ZUIM *et al.*, 2005).

Em *B. glabrata*, altamente susceptíveis ao *S. mansoni*, por exemplo, esporocistos e cercárias são observados em grande número e desenvolvem-se quase sem reação tecidual do molusco. Por outro lado, os moluscos resistentes eliminam poucas cercárias. A capacidade de um caramujo infectado liberar cercárias é bem correlatada com a histopatologia (GUARALDO *et al.*, 1981; LEMOS; ANDRADE, 2001; AZEVEDO; BORGES; ANDRADE, 2004).

A reação celular em forma de encapsulação é conhecida por acompanhar a destruição dos esporocistos. O processo de encapsulação do esporocisto-mãe de *S. mansoni* em *B. glabrata* resistente foi traçado 72 horas após penetração do miracídio e envolveu dois estágios: alargamento do granuloma ao redor do esporocisto intacto seguido pela desintegração do parasito e diminuição do tamanho do granuloma (CHENG; GARRABRANT, 1977).

A defesa interna no molusco *B. glabrata* contra a larva do *S. mansoni*, tem mostrado que o encapsulamento e posterior fagocitose realizada pelos hemócitos sobre o material não-próprio, representariam a resposta imune desenvolvida por esses organismos. Juntamente com as substâncias citotóxicas que atuam sobre as larvas, que são liberadas pelos hemócitos após o encapsulamento, os metais também estão presentes e integram-se à hemolinfa para compor o processo de defesa (SANTOS *et al.*, 2005).

Entre as substâncias integrantes da hemolinfa de *B. glabrata*, a hemoglobina constitui 97% das proteínas totais aí presentes. Observou-se também, que esta hemoglobina apresentou 0,315% de ferro (SANTOS *et al.*, 2005).

O hepatopâncreas é relatado como o órgão capaz de realizar o armazenamento do ferro. É sabido desde 1883 que o cálcio se acumula em grandes quantidades no hepatopâncreas de *Helix* e é transferido para a concha para atender as exigências de crescimento e reparo (HENEINE; GAZZINELLI; TAFURI, 1969). Outros trabalhos mostram o hepatopâncreas como sítio de acúmulo de metais (FRAGA DE AZEVEDO *et al.*, 1958; YAGER; HARRY, 1966).

O ferro é um metal importante para as funções celulares e pode ser considerado como imunomodulador essencial para as funções imunológicas e de homeostase celular. A carência de ferro resulta em produção reduzida de anticorpos, enquanto o excesso provoca tanto deficiência como aumento da função humoral (SANTOS *et al.*, 2005).

Foi demonstrado que não existe uma redução da hemoglobina na hemolinfa de *B. glabrata* parasitado por *S. mansoni*, postulando que a perda desse pigmento pode ser em parte devido à hemorragia causada pela locomoção em massa de cercárias. Além disso, os autores relataram que a hemoglobina pode ser degradada, absorvida e utilizada pelos esporocistos como fonte de nitrogênio (LEE; CHENG, 1972).

1.6 Evolução do *schistosoma mansoni* no hospedeiro intermediário

Nos hospedeiros intermediários, caramujos do gênero *Biomphalaria*, ocorre a multiplicação do parasito, resultado de uma sofisticada sintonia entre o metabolismo do hospedeiro e do parasito. Esta fina sintonia pode ser inferida pela estrita dependência entre linhagens geográficas de *S. mansoni* e respectivas linhagens geográficas dos moluscos. Assim, o sucesso evolutivo do *S. mansoni* em seus hospedeiros intermediários depende dos fatores ambientais, do comportamento biológico dos miracídios e hospedeiros intermediários, da compatibilidade fisiológica e bioquímica entre parasito-hospedeiro intermediário, dos mecanismos intrínsecos de defesa dos moluscos transmissores e dos mecanismos adaptativos do parasito ao organismo do molusco (COELHO; CARVALHO; LENZI, 2008).

Alguns aspectos comportamentais e químicos favorecem o encontro do miracídio, com seu hospedeiro-alvo. Quanto ao mecanismo quimiotático que leva ao encontro do miracídio com seu hospedeiro intermediário, a literatura ainda é controversa. Deve-se considerar que, em muitos habitats, onde ocorre a transmissão, as águas são correntes e isto dificulta um verdadeiro mecanismo de quimiotaxia, pela diluição e dispersão das moléculas

de atração. Na verdade, o que ocorre é uma estimulação dos movimentos do miracídio pela presença de moléculas do caramujo na água, processo chamado de quimiocinesis (CHERNIN, 1970, 1972, 1974).

A capacidade de penetração do miracídio restringe-se a cerca de 8 horas após a eclosão e é notavelmente influenciada pela temperatura (MALDONADO; ACOSTA-MALTIENZO, 1947). O contato com o tegumento do molusco provoca uma descarga do conteúdo das glândulas de adesão que iniciam a ação de digestão de tecidos. A ação combinada dos intensos movimentos do miracídio e da ação enzimática constitui o elemento que permite a introdução do miracídio nos tecidos do molusco. O epitélio é ultrapassado e a larva se estabelece no tecido subcutâneo. O local de penetração pode ser representado por qualquer ponto das partes expostas do caramujo, sendo, porém, a massa cefalopodal, principalmente a base das antenas e o pé, os pontos preferidos (COELHO, 1957).

O processo de penetração dura entre 10 e 15 minutos e cerca de apenas 30% dos miracídios são capazes de penetrar e evoluir em *B. glabrata*; 30% penetram, mas não evoluem; e 40% são incapazes até mesmo de penetrar no molusco (CHERNIN; ANTOLICS, 1975).

Mais de 90% dos esporocistos-mãe estão localizados em áreas expostas como a região cefalopodal, tentáculos, pseudobrânquia e colar do manto. Os parasitos usualmente se desenvolvem próximos aos sítios de penetração, um pequeno número migra para os tecidos mais profundos, como a artéria do pé e o canal deferente. A migração limitada, tanto em número quanto em distância, ocorre apenas em 48 horas de infecção (PAN, 1965).

Observações realizadas na rota de migração dos esporocistos-filhos 18-35 dias pós-infecção mostraram que uma pequena reação tecidual parece não influenciar no processo. Os esporocistos-filhos foram comumente observados no tecido conjuntivo das cristas renais. Nessa área cerca de 30 organismos por molusco foram freqüentemente vistos. Um número menor de esporocistos foi visto no músculo columelar e na parede do intestino e foram raramente encontrados no pseudoceloma, lúmen do coração, saco pericárdico, veias e artérias, sistema nervoso ou tratos genitais. Os esporocistos-filhos podem iniciar seu desenvolvimento durante sua migração para o hepatopâncreas. Contudo, as características da maturação ocorrem depois que eles atingem o hepatopâncreas ou menos freqüentemente o ovotéstis. Esporocistos-filhos maduros contendo cercárias foram ocasionalmente observados na crista renal (PAN, 1965). A localização final dos esporocistos será nos espaços intertubulares da glândula digestiva, local com abundante riqueza nutritiva (COELHO; CARVALHO; LENZI, 2008).

Em secções de moluscos com infecções maduras, cercárias morfológicamente intactas foram observadas próximas aos seios por baixo da camada epitelial do fígado e nos seios ao longo do intestino. Usualmente, um número bem pequeno de cercárias foi encontrado no sistema arterial ou no lúmen do coração, apesar de em moluscos com infecção madura, as artérias e o coração foram freqüentemente dilatados e congestionados com a hemolinfa e os hemócitos (PAN, 1965). As cercárias mais diferenciadas no interior do molusco predominam na região cefalopodal, mas as várias etapas de diferenciação ocorrem nos locais usualmente mais parasitados, como as glândulas digestivas, ovotéstis e túbulos renais (COELHO; CARVALHO; LENZI, 2008).

1.7 Sistema de células pigmentares

Nos vertebrados heterotérmicos, células contendo melanina podem ser encontradas em vários tecidos e órgãos como o fígado, baço, pulmões, etc. Essas células são consideradas como pertencendo ao sistema retículo histiocítico, também definido como sistema fagocítico mononuclear (BARNI *et al.*, 1999).

Os melanócitos são células grandes e irregulares, com citoplasma abundante e intensamente pigmentado devido ao acúmulo de melanina que estas próprias células sintetizam e constituem grânulos denominados melanossomos (OLIVEIRA; ZIERI, 2005).

Em répteis, anfíbios e outros vertebrados, os melanócitos estão localizados próximos da pele, mas o pigmento melânico também pode ser encontrado em localizações viscerais como o fígado, rim, baço, peritônio, ao redor de vasos sanguíneos e em outros locais como o cérebro e ouvido, com diferentes ocorrências, tipos e quantidade em diferentes espécies (ZUASTI *et al.*, 1998; OLIVEIRA; ZIERI, 2005).

Alguns autores acreditam que as células pigmentares, em répteis e anfíbios, derivam das células de Kupffer que progressivamente se tornam pigmentadas. O comportamento particular dessas células, além de fagócitos profissionais, é a síntese de melanina (CORSARO *et al.*, 2000). Também é sugerido que os melanócitos possuem uma função importante na regulação térmica dos répteis (ZUASTI *et al.*, 1998).

A nomenclatura dessas células não é consensual e, por isso, recebem várias denominações, principalmente nos seguintes órgãos: fígado (como sinônimo das células de Kupffer), rins, baço e menos frequentemente em outras localizações, com os termos – células

pigmentares, células pigmentares extracutâneas, macrófagos pigmentados, melanomacrófagos, melanóforos, melanófagos e melanócitos (OLIVEIRA; ZIERI, 2005).

Esse sistema pigmentar extracutâneo é composto por nódulos formados por grandes agregados de células que contém melanina que lembram os macrófagos. Os nódulos foram chamados de centros melanomacrófagos devido a sua capacidade de fagocitar. Essa função é desempenhada pela melanina produzida por eles mesmos (ZUASTI *et al.*, 1998).

Nesse mesmo estudo, os autores encontraram que o parênquima hepático contém numerosos centros melanomacrófagos de diferentes tamanhos e formas com melanócitos agrupados, parcialmente conservando sua membrana citoplasmática e rodeado por uma cápsula de tecido conjuntivo (ZUASTI *et al.*, 1998).

A função fisiológica das células pigmentares no parênquima do fígado de vertebrados inferiores, em adição a atividade fagocítica, é agir contra as substâncias citotóxicas endógenas e exógenas. Um aumento no melanomacrófagos do fígado tem sido encontrado em associação com uma variedade de doenças infecciosas (BARNI *et al.*, 1999).

Apesar de muitos trabalhos relatando a relação parasito-hospedeiro em *S. mansoni*, o aparecimento de células pigmentares ainda não foi encontrado em invertebrados. Assim, a confirmação da presença dessas células se torna importante na elucidação do seu papel na relação parasito-hospedeiro.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Descrever o sistema pigmentar extrategumentar de *Biomphalaria glabrata* infectada e não infectada pelo *Schistosoma mansoni* e as alterações histológicas ocorridas pós-infecção.

2.2 Objetivos Específicos

1. Descrever a estrutura celular do sistema pigmentar extrategumentar de *B. glabrata* não infectada;
2. Descrever a estrutura celular do sistema pigmentar extrategumentar de *B. glabrata* infectada;
3. Avaliar as alterações patológicas causadas no molusco pelo *S. mansoni* em diferentes períodos da infecção

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Moluscos

Os caramujos utilizados para análise neste trabalho foram todos adultos de *Biomphalaria glabrata* de Belo Horizonte (BH) mantidos no Laboratório de Pesquisa em Parasitologia e Biologia de Moluscos (LPPBM)/DACT (Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas)/UFC sob condições controladas de temperatura (26°C) e acesso a alimento apropriado.

3.2 Parasito

A cepa utilizada foi a LE de *S. mansoni* isolada primeiramente de fezes de um paciente de Belo Horizonte e mantida no LPPBM/DACT/UFC há mais de 10 anos.

3.3 Camundongos

Foram utilizados camundongos Swiss (*Mus musculus*) fêmeas, com idade aproximada de 20 dias, mantidos no biotério do LPPBM para a manutenção do ciclo vital do *S. mansoni* e obtenção dos miracídios.

A infecção dos camundongos foi realizada através da inoculação de cercárias por via transcutânea. Para cada camundongo foi utilizado um volume de 0,5 ml contendo, aproximadamente, 100 cercárias. Essas cercárias foram obtidas através de caramujos infectados mantidos no LPPBM. O exame de ovos de *S. mansoni* em camundongos submetidos à infecção experimental foi realizado após 42 dias da exposição às cercárias pelo Método de Hoffmann (AMARAL; THIENGO; PIERI, 2008).

3.4 Infecção dos moluscos

Foi utilizado o método de exposição individual padronizada. A linhagem BH de *B. glabrata* foi infectada com cepa LE de *S. mansoni*. A exposição foi feita colocando os moluscos individualmente em frascos pequenos (20 ml), contendo 10 miracídios em 10 ml de água. A obtenção dos miracídios foi realizada seguindo a técnica preconizada por Paraense e Correa (1963), descrita, resumidamente, abaixo:

- Os camundongos infectados com cercárias de *S. mansoni* foram observados por 42 dias. Após esse período as fezes dos camundongos foram concentradas pelo método de Hoffman. Com a positividade do exame, os camundongos foram anestesiados com Pentobarbital sódico (Nembutal®) e, em seguida, eutanasiados para a retirada do fígado. Uma média de oito fígados foram utilizados para a infecção dos moluscos. Aos fígados foram adicionados 200 ml de água filtrada e a mistura foi, então, triturada no liquidificador por, aproximadamente, 50 segundos sendo, em seguida, transferida para um cálice. A cada 40 minutos, o sobrenadante foi desprezado e o cálice novamente completado com água até a marca de 1 litro até a obtenção de um sobrenadante relativamente limpo. Em seguida, o precipitado foi colocado em um refratário de vidro sob 2 lâmpadas de 60W e a após 40 minutos foram iniciadas as observações para o encontro do miracídio através da leitura de lâminas em lupa. Em cada frasco foram colocados 10 miracídios e um caramujo (Fig. 5).



Fig. 5 - Moluscos *B. glabrata* expostos individualmente a 10 miracídeos de *S. mansoni*.

Fonte: Vigilância e Controle de Moluscos de Importância Epidemiológica: Diretrizes Técnicas, 2008.

Após a exposição, os moluscos foram mantidos em frascos contendo 100 ml de água e alimentação controlada. Os caramujos foram observados duas vezes por semana para verificação da mortalidade e analisados, ao final de 30 dias, quanto à eliminação de cercárias para confirmar à infecção (BASTOS; SCHIAVOTELO; RIBEIRO, 1984).

Foram utilizados 94 caramujos divididos em dois grupos, assim descritos:

GRUPO I – 50 caramujos não infectados;

GRUPO II – 44 caramujos infectados experimentalmente pelo *S. mansoni*.

A cada 10 dias de infecção foi retirado um grupo até o 30º dia pós-infecção. No decorrer da infecção 43,2 % dos caramujos morreram. Os grupos foram numerados em A (grupo com 10 dias de infecção) totalizando 8 cortes analisados; A' (grupo com 20 dias de infecção) com 7 cortes analisados; A'' (grupo com 30 dias de infecção) com 4 cortes analisados. Para cada exemplar foram realizados 9 cortes histológicos.

3.5 Retirada da parte mole do molusco

Os caramujos foram colocados em solução anestésica (Nembutal® 0,05%) até a observação do seu total relaxamento verificado com um pincel ou um estilete. O tempo necessário para a ação do anestésico foi de 8 horas.

Em seguida, os espécimes foram transferidos, um a um, para um coador de plástico ou metal e mergulhados em água previamente aquecida a 70°C, durante 30 segundos seguido de um banho em água à temperatura ambiente para que ocorresse o resfriamento do molusco e o descolamento da parte mole com a concha.

Com uma pinça fina o exemplar foi segurado pela concha e, com outra pinça, o pé do molusco, puxando-o com uma suave tração. O músculo foi desprendido e a parte mole foi extraída da concha, que foi sendo ocupada pela água, de forma a diluir os resíduos da hemolinfa, facilitando a extração. Colocamos a parte mole no fixador Railliet-Henry (Fig. 6).



Fig. 6: Etapas do processo de separação da parte mole e concha (A, B, C e D). Em E, separação da concha e da parte mole.

Fonte: Vigilância e Controle de Moluscos de Importância Epidemiológica: Diretrizes Técnicas, 2008.

3.6 Corte e análise histológica dos moluscos

Os moluscos imersos no fixador foram levados para a etapa histológica. A primeira etapa do procedimento foi a lavagem em álcool a 70% para retirar o excesso de fixador. Em seguida foi realizada a diafanização com xilol e finalmente a inclusão em parafina. Todos os exemplares foram incluídos em posição padronizada com a região cefalopodal à esquerda. Foram feitas secções microtômicas com 5 micra de espessura e em seguida coradas por HE (Hematoxilina-Eosina), Giemsa de Lennert para visualização de bactérias, PERL's para ferro, Von Kossa para cálcio, PMA Picro-Sirius para colágeno em microscópio confocal, Tricromatrica de Masson para prata, PAS – Alcian Blue pH 1 e 2,5 para conjuntivo e Fontana-Masson para melanina. Após as colorações foi feita a montagem com lamínulas e bálsamo do Canadá. A observação dos preparados histológicos foi realizada em microscópio óptico e confocal.

3.7 Documentação dos achados histológicos

Os cortes histológicos foram fotodocumentados através da câmera AxionCam HRC acoplada ao microscópio Axiovert e visualizadas através do programa Axiovision versão 4.2.

A visualização das fotografias com a coloração de PMA Picro-sirius foi realizada através do programa LSIMAGER BROWSER ZEISS ®.

3.8 Aspectos éticos da pesquisa

Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal – CEPA da Universidade Federal do Ceará – UFC, de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), sob protocolo nº30/08.

4 RESULTADOS

As análises feitas no molusco *B. glabrata* envolveram três regiões específicas do caramujo: região cefalopodal, cavidade do manto e crista renal. A escolha dessas áreas se deu devido à grande quantidade de células reticulares pigmentares encontradas e devido a problemas durante os cortes o que impossibilitou uma observação detalhada de outras áreas do molusco em todos os espécimes analisados.

Através da observação dos cortes histológicos por microscopia, diversos aspectos se mostraram diferentes em relação ao número, distribuição e morfologia das células pigmentares bem como as alterações histopatológicas ocorridas nos moluscos nas três fases de infecção que foram avaliadas (Tabela 1).

Tabela 1: Localização dos achados histológicos em molusco não infectado e moluscos infectados nos três períodos analisados.

Achado Histológico	Localização dos Achados Histológicos			
	Não Infectado	Infectado		
		10	20	30
Célula Dendrítica Pigmentar	Região Cefalopodal (muscular)	Região Cefalopodal (muscular)	Região Cefalopodal (muscular)	Região Cefalopodal (muscular)
Célula Reticular Pigmentar	Disseminada (todo o corpo)	Colar do Manto Crista Renal	Crista Renal	Crista Renal
Granulomas Bacterianos	Cefalopodal	Cefalopodal Colar do Manto Crista Renal	Disseminados (todo o corpo)	Disseminados (todo o corpo)
Hemócitos	Disseminados (todo o corpo)	Disseminados (todo o corpo)	Crista Renal	Disseminados (todo o corpo)
Esporocistos I	--	Cefalopodal	--	--
Esporocistos II	--	--	Crista Renal Colar do Manto	Crista Renal Colar do Manto Cefalopodal
Cercárias	--	--	--	Cefalopodal Crista Renal

No grupo controle, 50 lâminas foram analisadas. No grupo infectado, na primeira análise, realizada com 10 dias de infecção, 8 exemplares tiveram seus cortes analisados. Em 20 dias de infecção, 7 espécimes e em 30 dias de infecção, 4 exemplares. Durante os 30 dias de infecção, 25 exemplares morreram.

4.1 Sistema pigmentar extrategumentar de *B. glabrata* não infectada

A observação da microscopia revelou a presença de duas categorias de células. Uma aparece, predominantemente, no músculo e nós a denominamos de célula dendrítica pigmentar pequena devido a sua morfologia (Fig. 7 e 8).

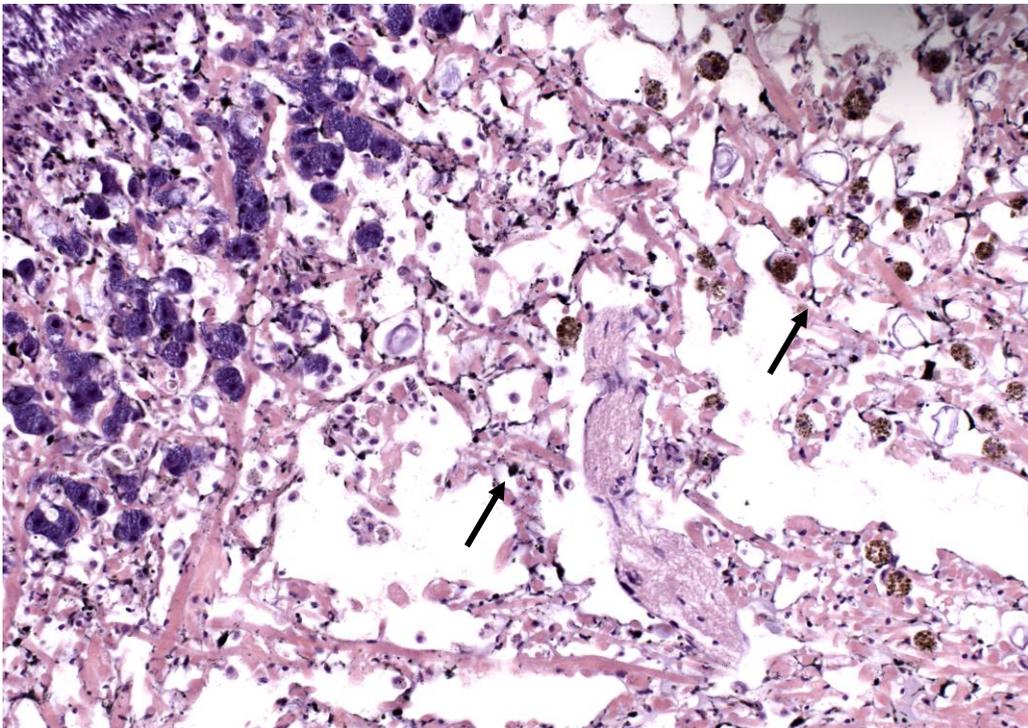


Fig. 7. Corte histológico da região cefalopodal de *B. glabrata* não infectado. Observar o acúmulo de células dendríticas pigmentares (setas) coradas por Hematoxilina-eosina (HE). x25.

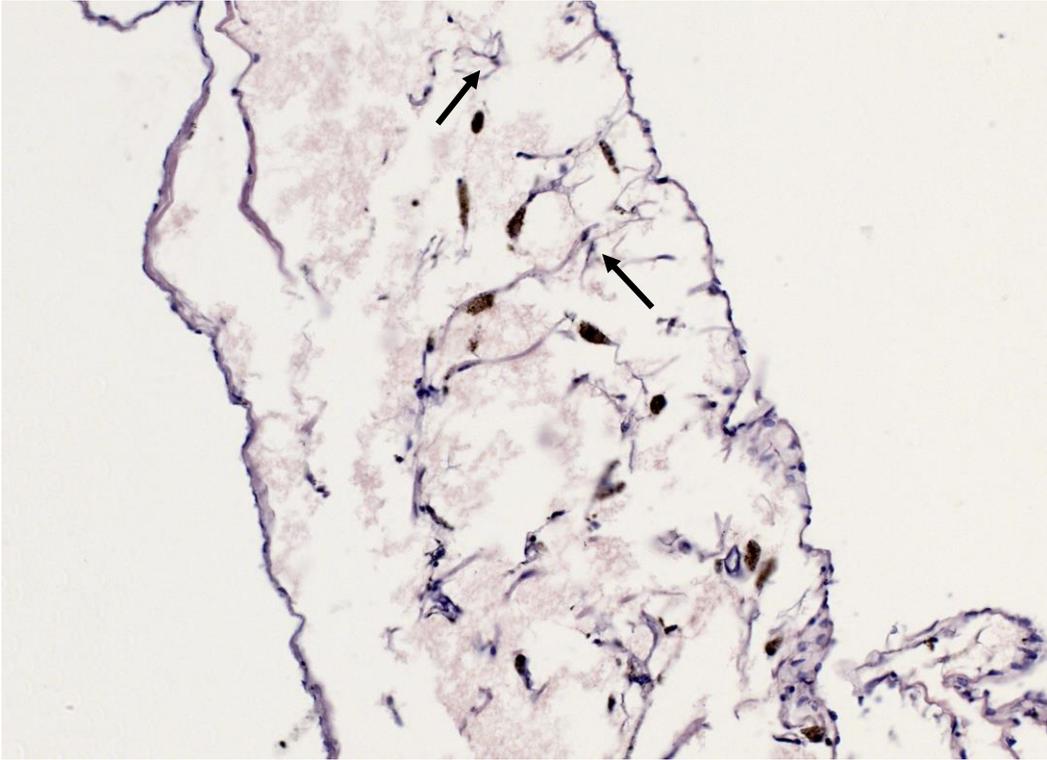


Fig. 8. Corte histológico da região da crista renal localizada acima do músculo columelar. Presença de células dendríticas pigmentares (setas) coradas por HE em molusco não infectado. x25.

E a segunda categoria apresentou distribuição mais ampla sendo chamada de célula reticular pigmentar. Essa categoria apresentou, ainda, padrão de distribuição em formato de “fila” (Fig. 9).

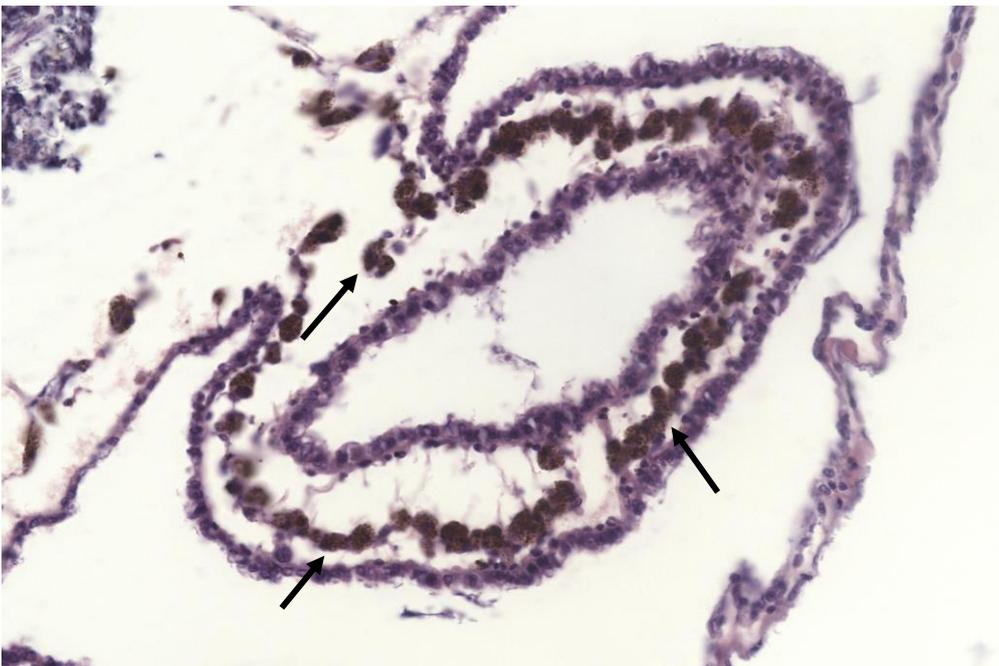


Fig. 9: Presença de células reticulares pigmentares (setas), em molusco não infectado, na crista renal seguindo o padrão de enfileiramento coradas por HE. x40.

Na região cefalopodal também foi encontrado a formação de granulomas que não interferiram no processo de pigmentação. No interior dessas estruturas foi observada a presença de bactérias (Fig 10).

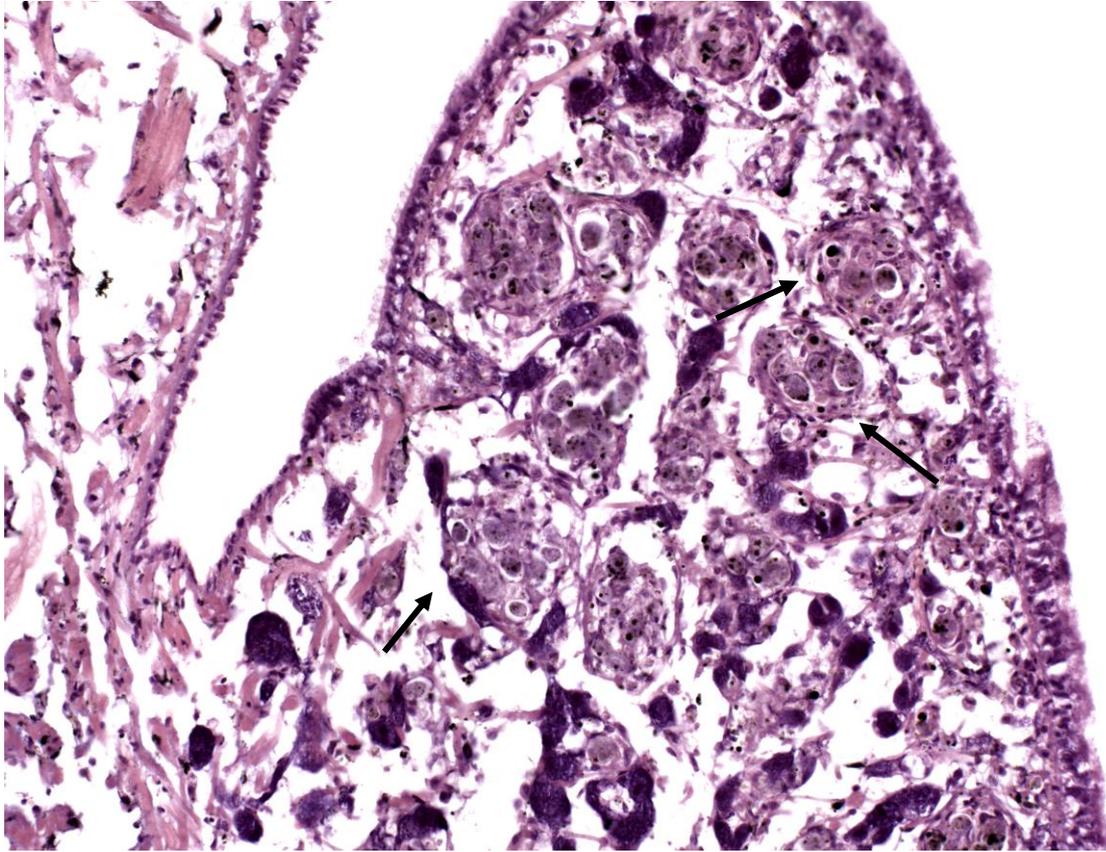


Fig. 10. Formação de granulomas bacterianos (setas) por toda a região cefalopodal do molusco não infectado corado com HE. x25.

4.2 Sistema pigmentar extrategumentar de *B. glabrata* infectada

O sistema pigmentar dos moluscos infectados também foi constituído pelas células dendríticas pigmentares pequenas e pelas células reticulares pigmentares. A localização das primeiras seguiu o mesmo padrão do grupo não infectado sendo encontradas tanto na região muscular como na região cefalopodal (Fig. 11).

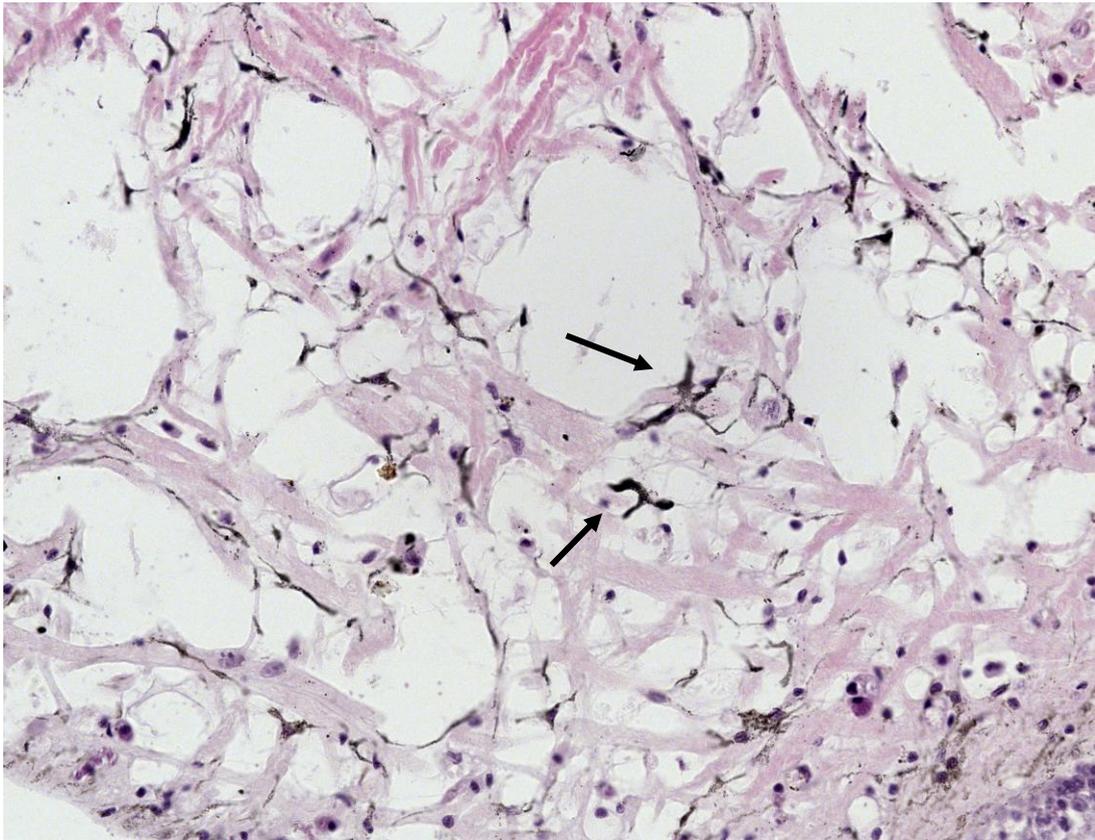


Fig. 11. Células reticulares (setas) localizadas na região cefalopodal em molusco infectado. HE, x25.

A localização das células reticulares ocorreu, mais intensamente, na região da crista renal e cavidade do manto (Fig. 12 e 13).

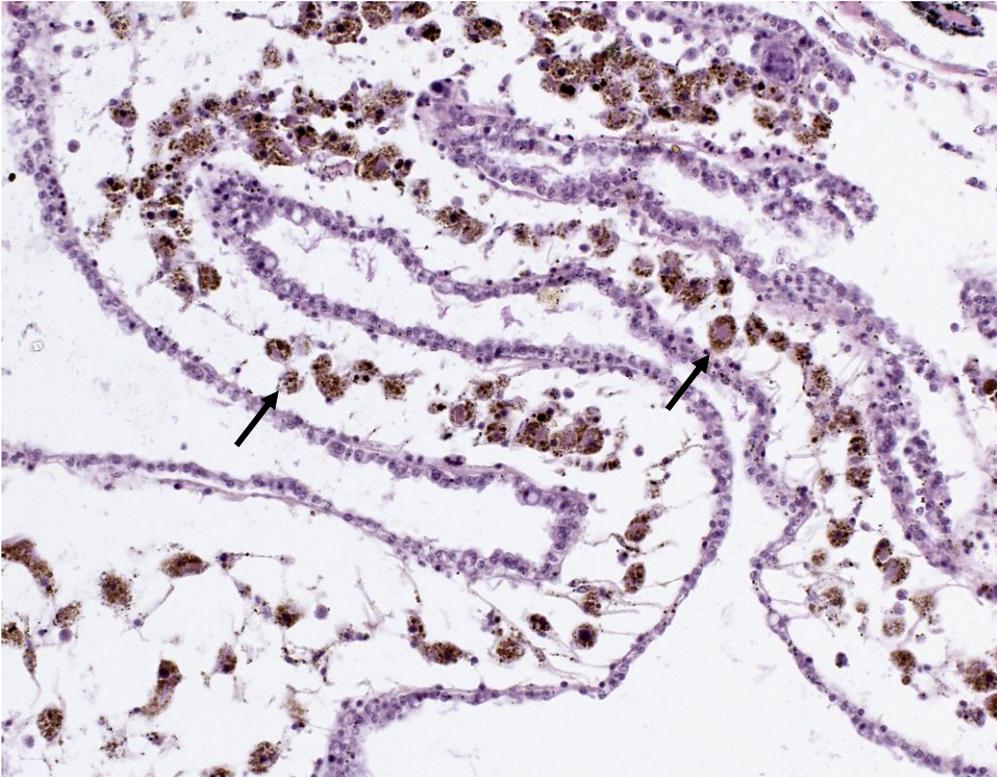


Fig. 12. Distribuição das células reticulares (setas) na crista renal de molusco infectado seguindo um padrão enfileirado. HE, x25.

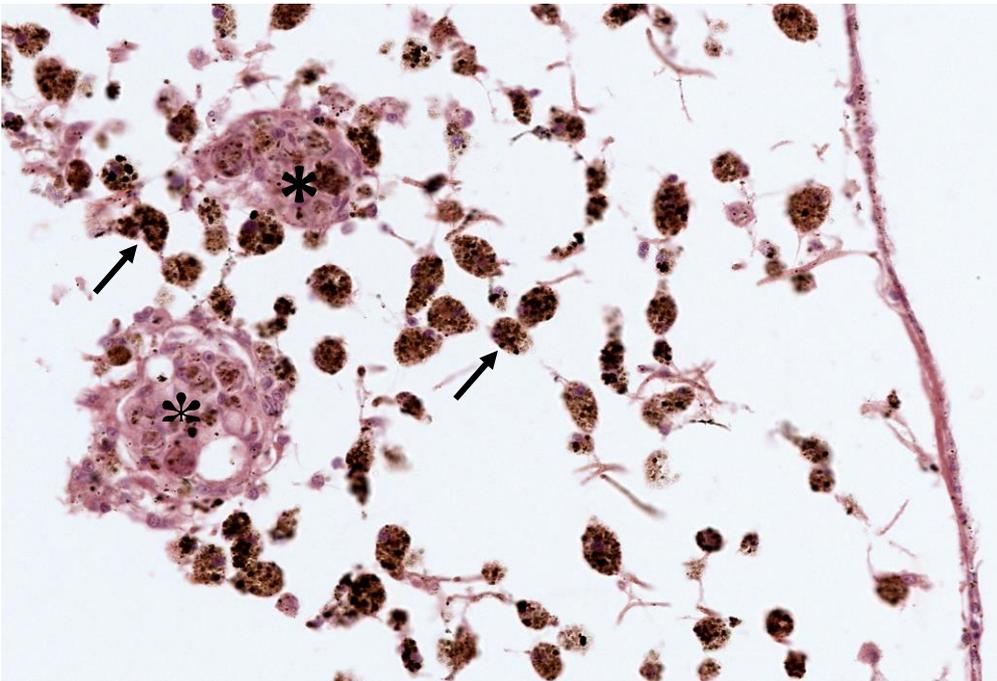


Fig. 13. Região do manto com presença de grande número de células reticulares (setas) e granulomas (*) em molusco infectado. HE, x40.

4.3 Alterações histopatológicas pós-infecção

4.3.1 Análises em moluscos com 10 dias de infecção

Neste período foi observada a presença dos granulomas bacterianos na região cefalopodal, colar do manto e região da crista renal (Fig. 14, 15 e 16).

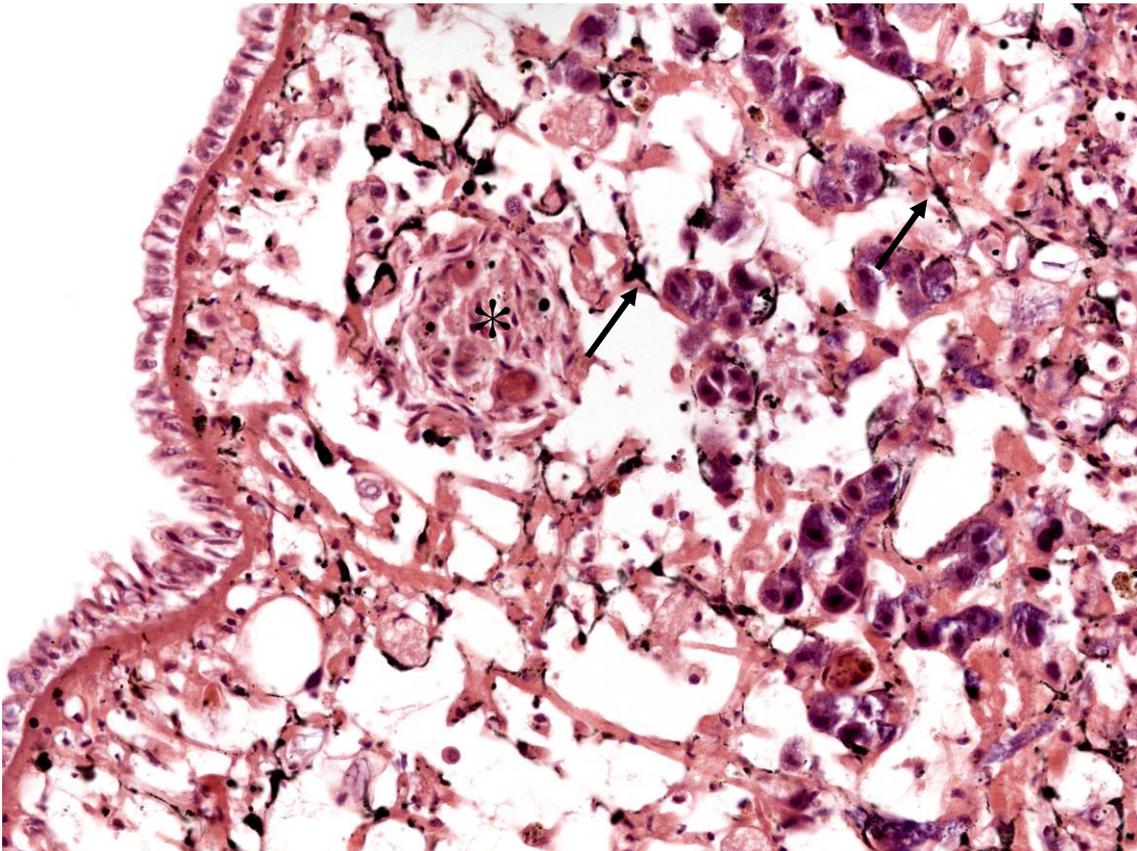


Fig. 14. Região cefalopodal com presença de granuloma bacteriano (*) e células dendríticas (setas) em molusco com 10 dias de infecção. HE, x40.

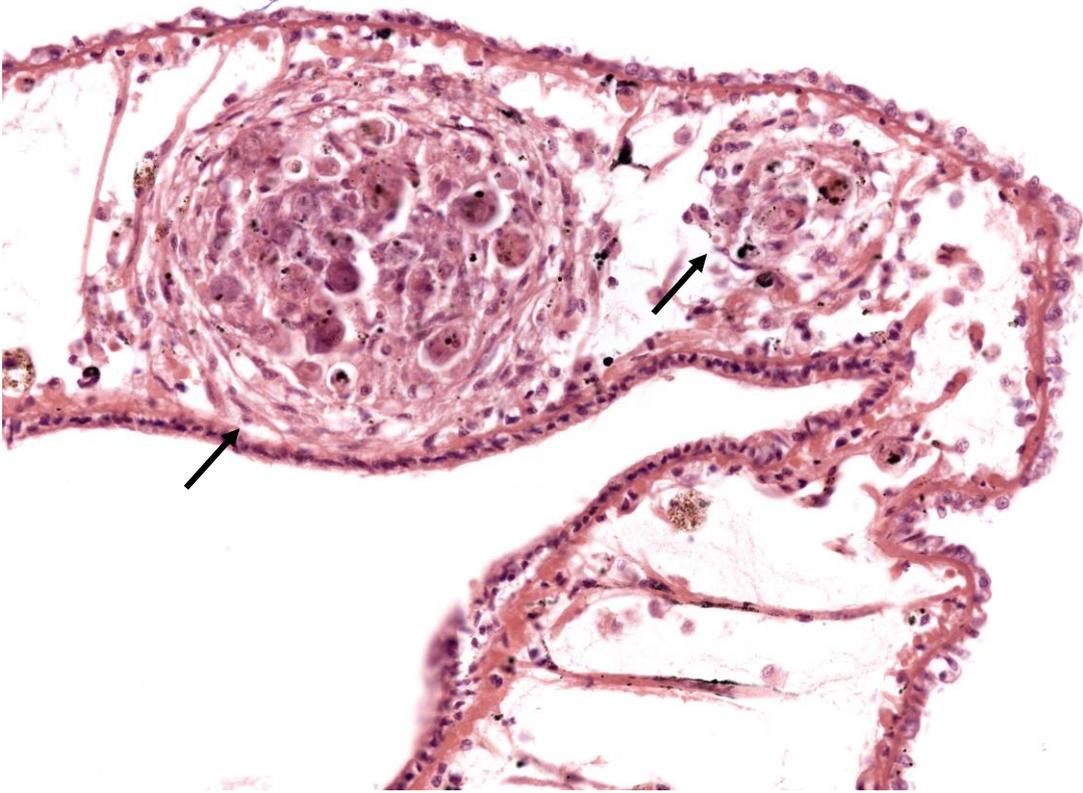


Fig. 15. Granulomas bacterianos (setas) na região do colar do manto em molusco com 10 dias de infecção. HE, x40.

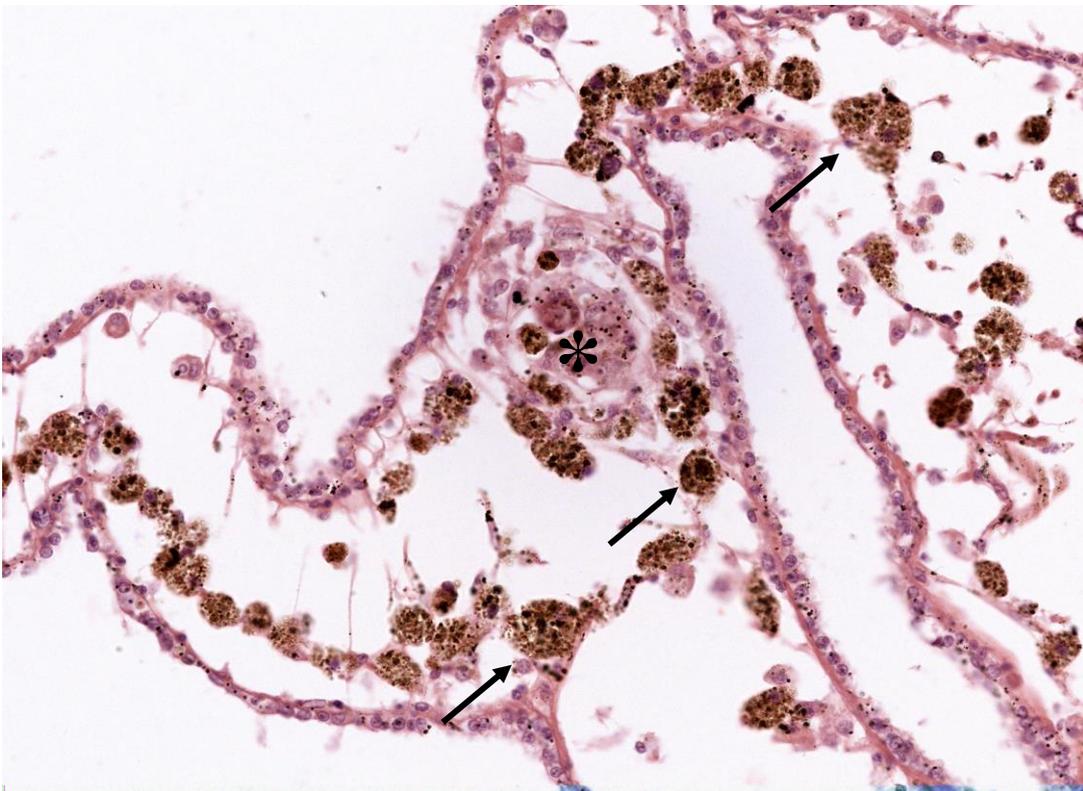


Fig. 16. Presença de granuloma bacteriano (*) e das células reticulares (setas) na região da crista renal de molusco com 10 dias de infecção. HE, x40.

Nesse período inicial da infecção (10 dias), as células dendríticas foram encontradas na região cefalopodal (muscular) (Fig. 17).

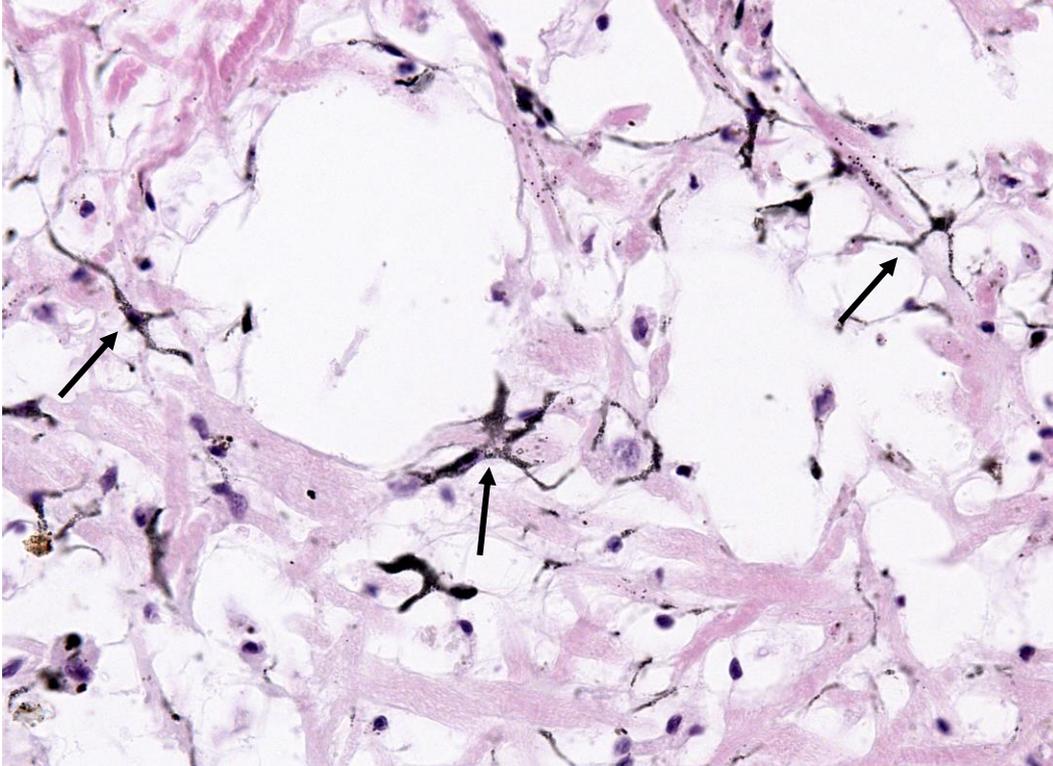


Fig. 17: Presença de células dendríticas (setas) na região cefalopodal de molusco com 10 dias de infecção. HE, x63.

A localização das células reticulares ocorreu nas regiões do colar do manto (Fig. 18) e na região da crista renal (Fig. 19). Na região do colar do manto não observamos um aumento considerável em seu número quando comparado ao grupo não infectado.

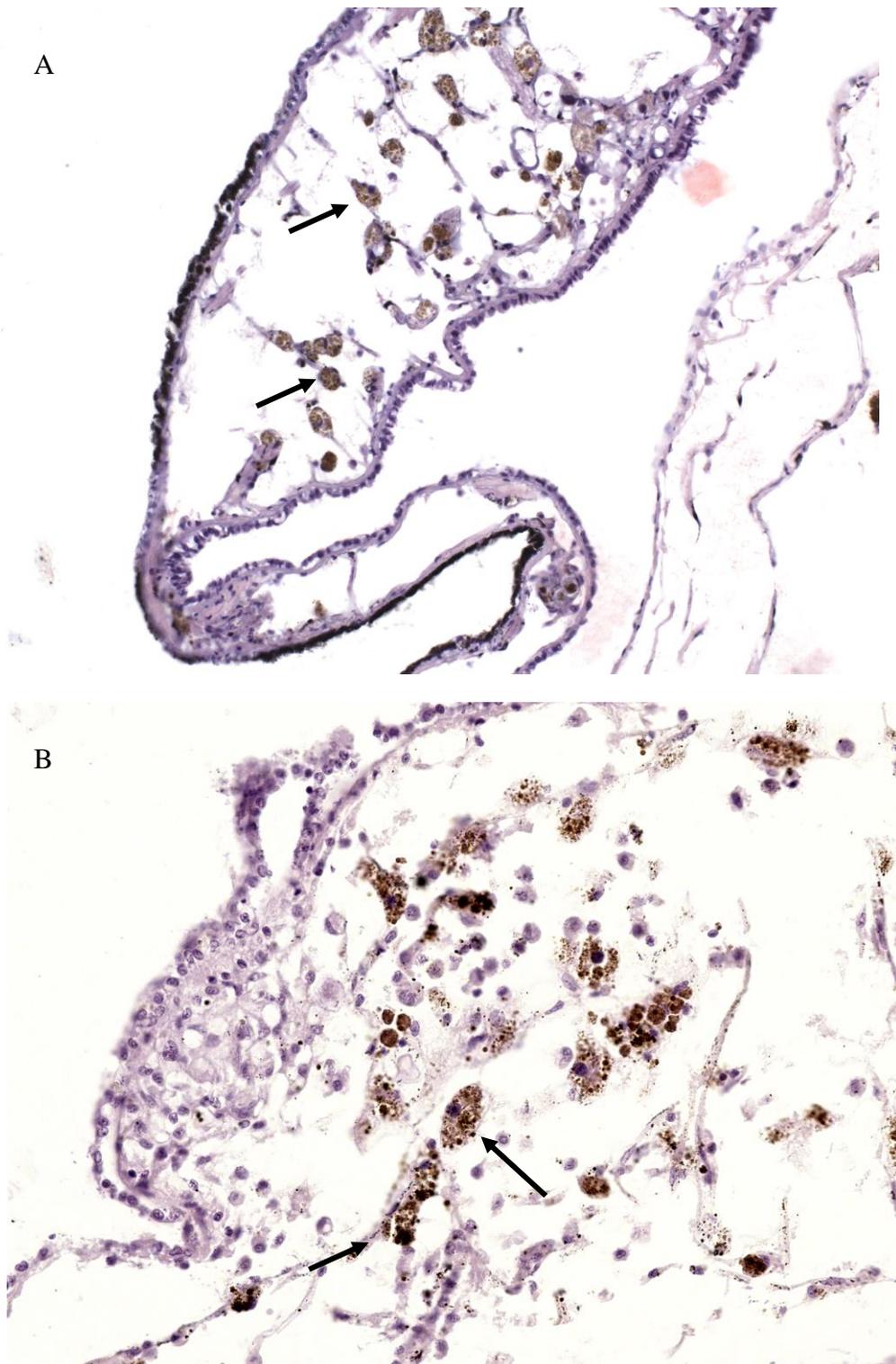


Fig. 18: Em A, células reticulares (setas) observadas no colar do manto no molusco não infectado. Em B, células reticulares (setas) localizadas na mesma região no molusco com 10 dias de infecção. HE, x25.

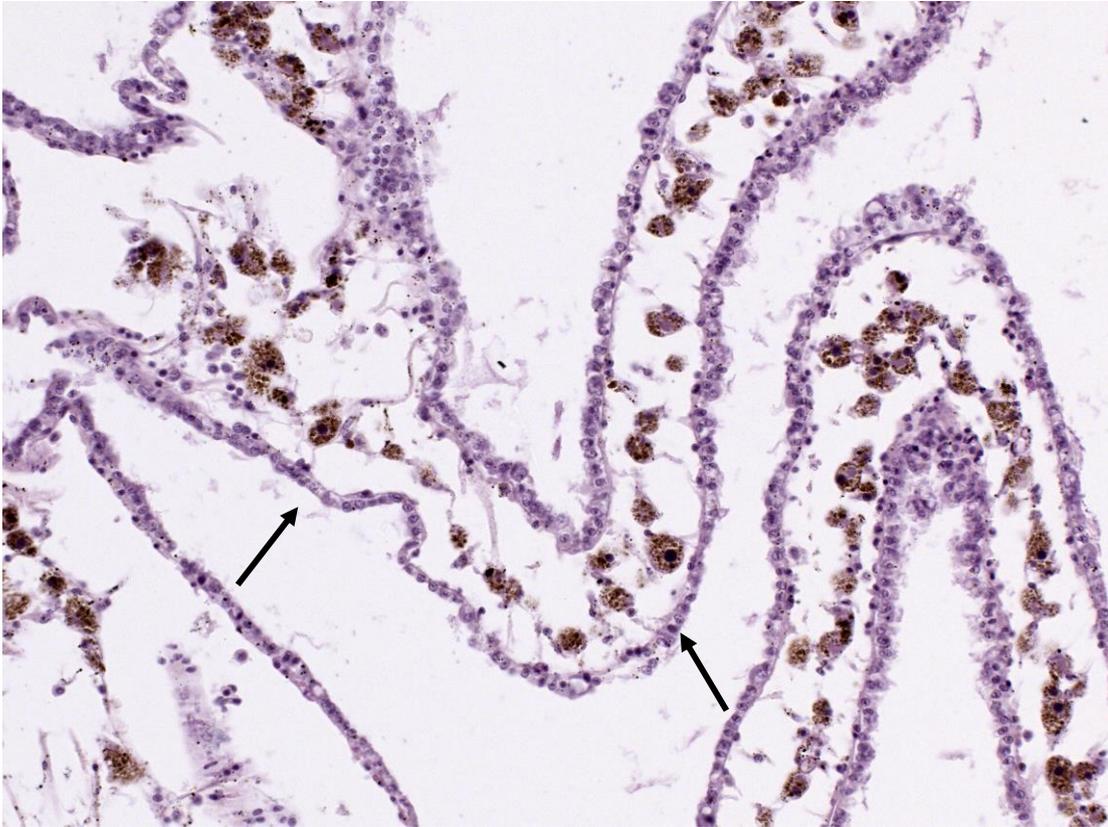


Fig. 19: Células reticulares (setas) localizadas na região da crista renal em molusco com 10 dias de infecção. HE, x25.

4.3.2 Análises em moluscos com 20 dias de infecção

Com vinte dias de infecção foi observado um aumento considerável das células reticulares localizadas, principalmente, na região da crista renal quando comparado com o grupo com 10 dias de infecção (Fig. 20 e 21). Um sítio de proliferação de hemócitos também foi encontrado na região da crista renal no mesmo período de análise (Fig. 22).

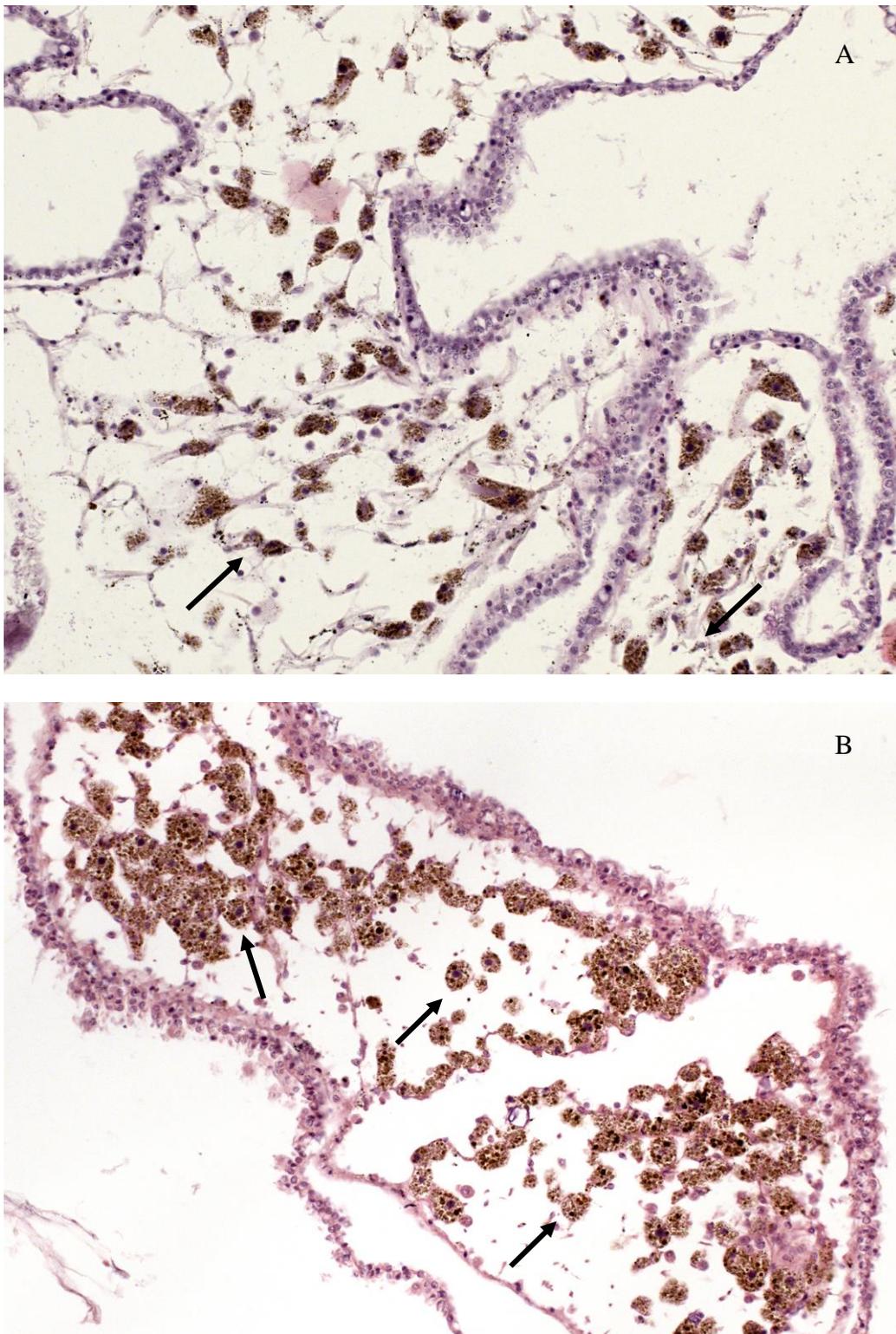


Fig. 20: Em A, células reticulares (setas) localizadas na região da crista renal no molusco com 10 dias de infecção. Em B, observar o aumento das células reticulares (setas) localizadas na região da crista renal em molusco com 20 dias de infecção. HE, x25.

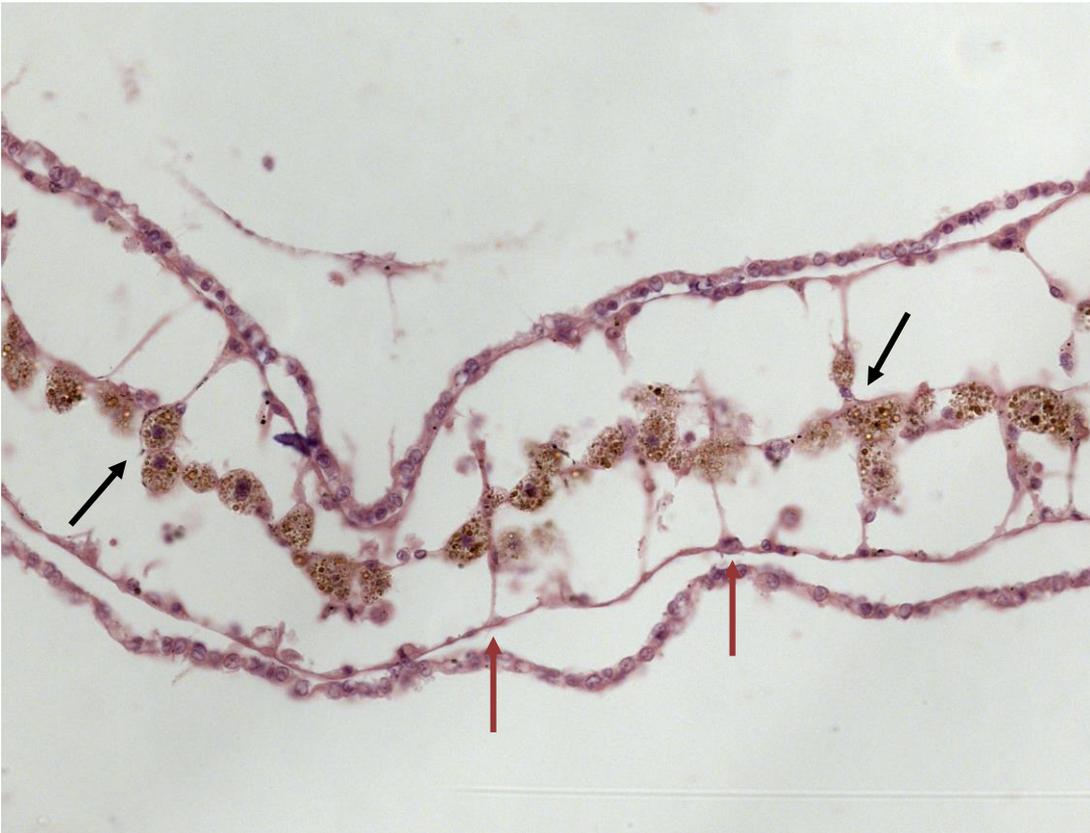


Fig. 21. Células reticulares (setas pretas) em conexão com as células subepitelióides (setas vermelhas) na região da crista renal em molusco com 20 dias de infecção. HE, x40.

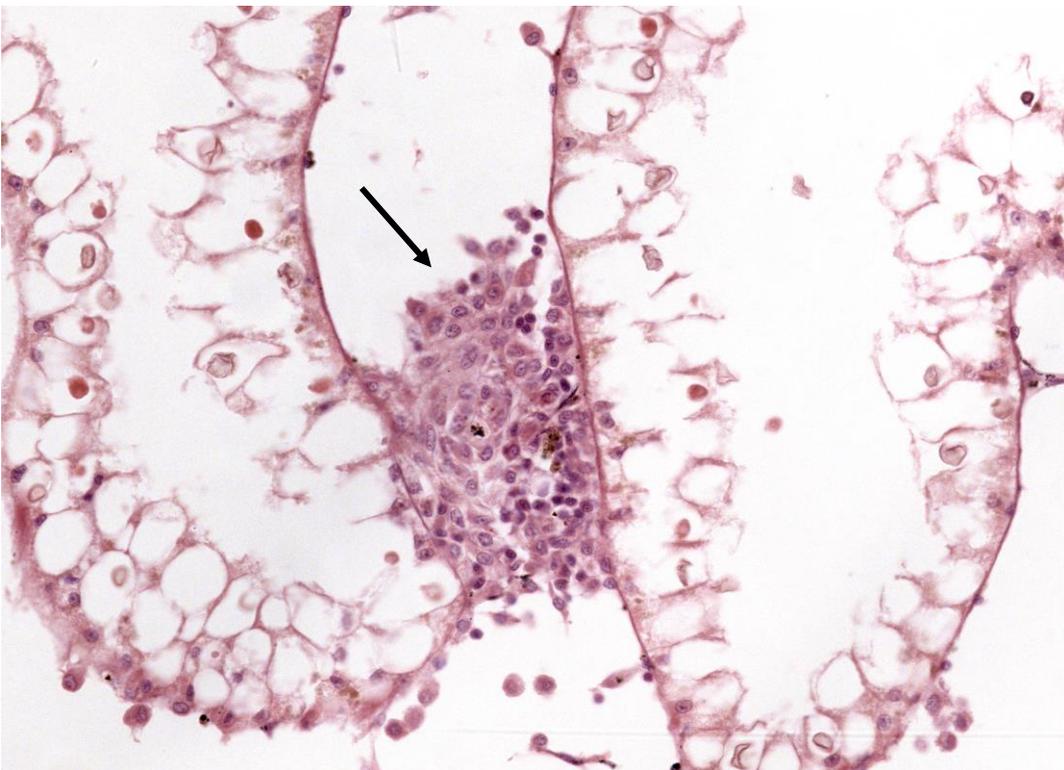


Fig. 22. Sítio de proliferação de hemócitos (seta) na região renal. HE, x63.

Com 20 dias de infecção foram observadas formas evolutivas como o esporocisto-filho (esporocisto II) na região da crista renal e cavidade do manto (Fig. 23 e 24, respectivamente) e esporocistos-filhos em diferenciação na região da cavidade do manto (Fig. 25). Nas três figuras é possível notar a presença das células reticulares pigmentares ao redor da cápsula dos esporocistos.

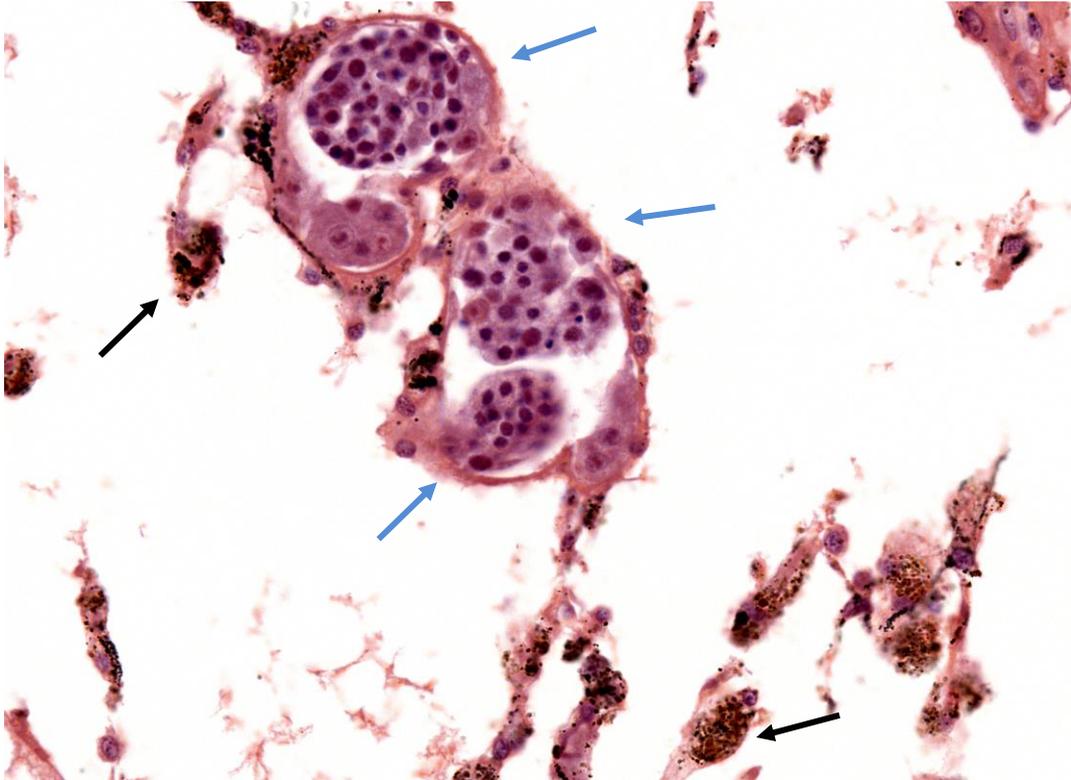


Fig. 23. Esporocistos-filhos (setas azuis) e células reticulares (setas pretas) na crista renal em moluscos com 20 dias de infecção. HE, x63.

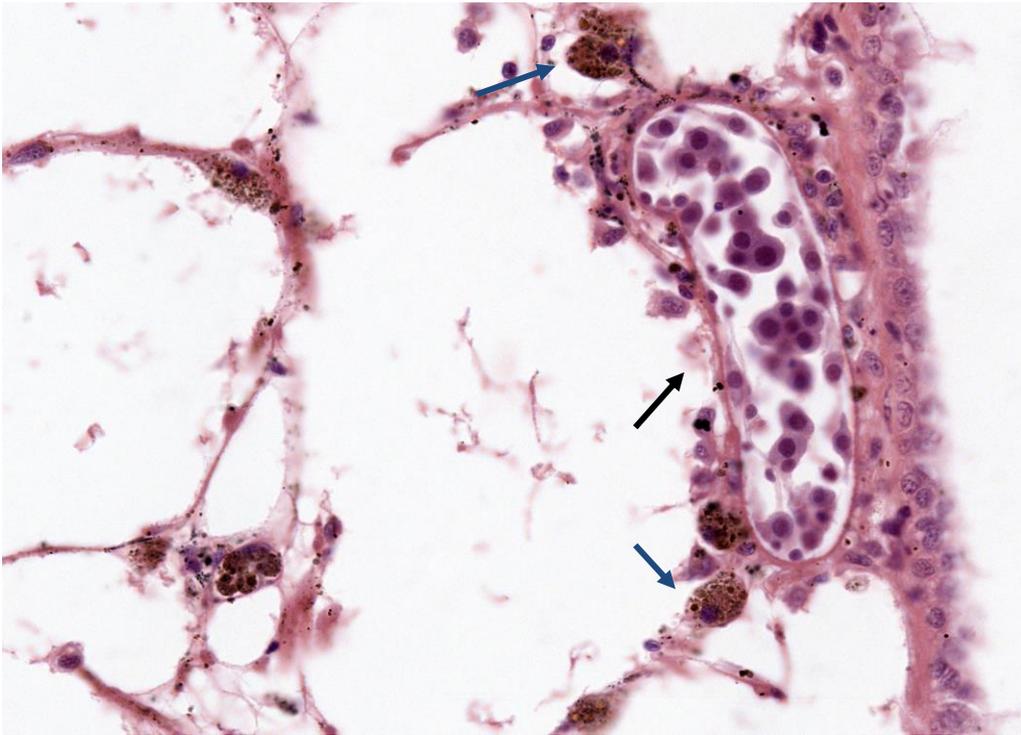


Fig. 24. Esporocisto-filho na cavidade do manto (seta preta) em molusco com 20 dias de Infecção e células reticulares pigmentares (setas azuis). HE, x63.

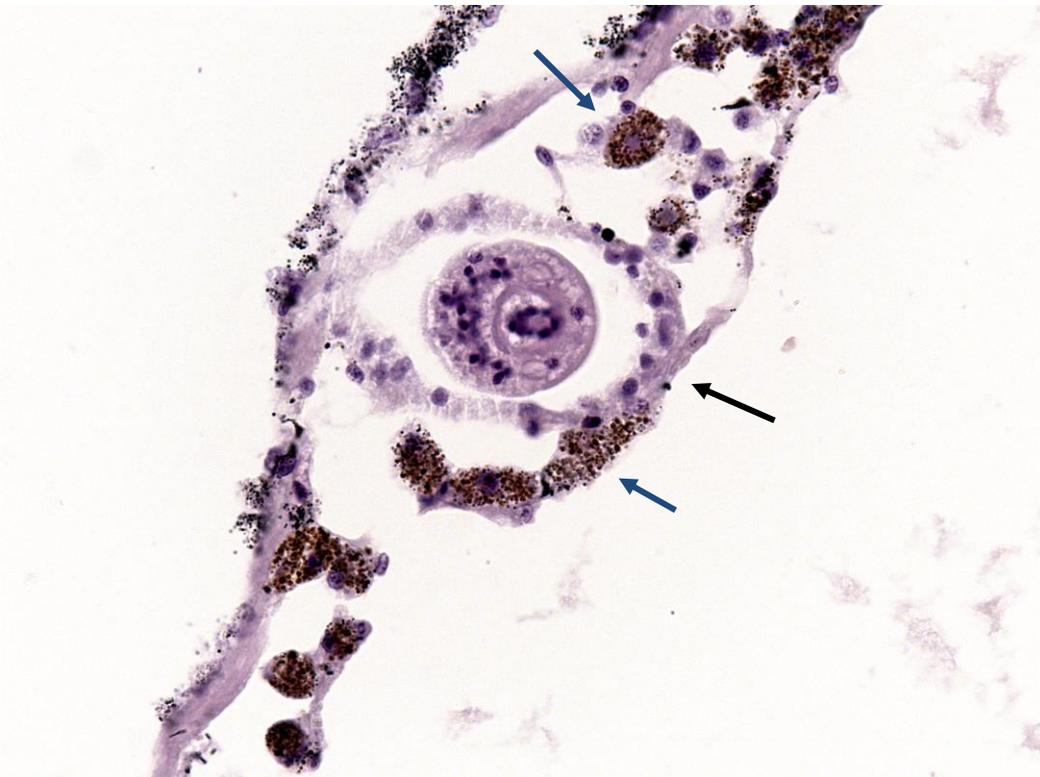


Fig. 25. Esporocisto-filho em diferenciação na cavidade do manto (seta preta) de molusco com 20 dias de infecção e células reticulares pigmentares (setas azuis). HE, x63.

Embora a análise dos resultados tenha sido realizada em três regiões específicas, os granulomas bacterianos foram encontrados com distribuição por todo o corpo do molusco (Fig. 26 e 27).

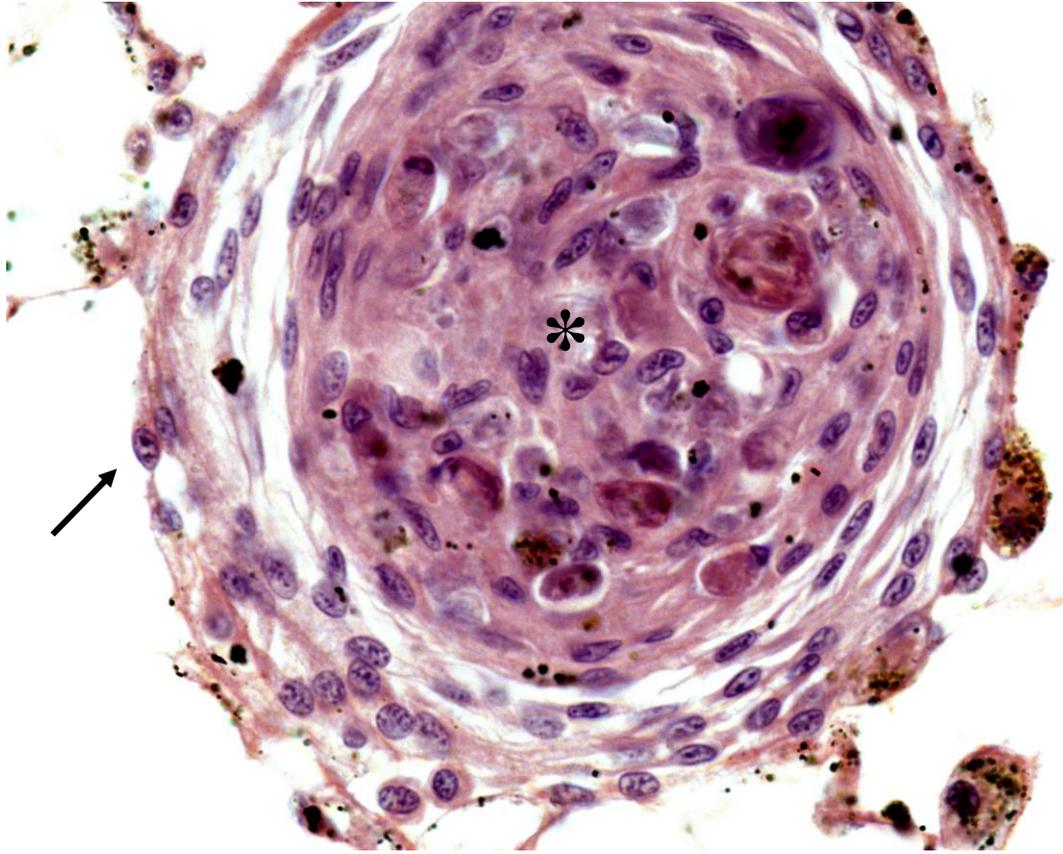


Fig. 26. Granuloma bacteriano, na crista renal, com duas zonas distintas. Uma central hemocitária (*) e uma periférica hemocitária fibroblastóide com hemócitos assumindo aspecto epitelióide (seta) em molusco com 20 dias de infecção. HE, x63.

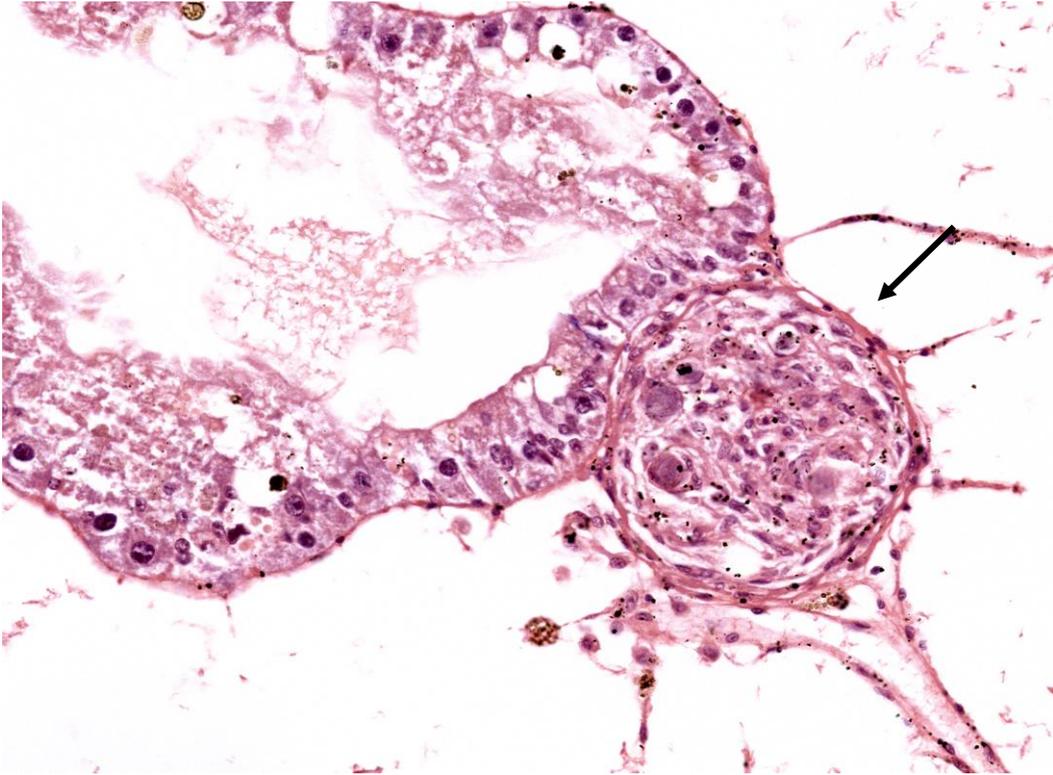


Fig. 27. Granuloma (seta) localizado na região do hepatopâncreas. HE, x40.

4.3.3 Análises em moluscos com 30 dias de infecção

Com trinta dias de infecção ocorreu uma diminuição tanto em tamanho quanto em quantidade das células reticulares quando comparadas com o grupo com 20 dias de infecção (Fig. 28).

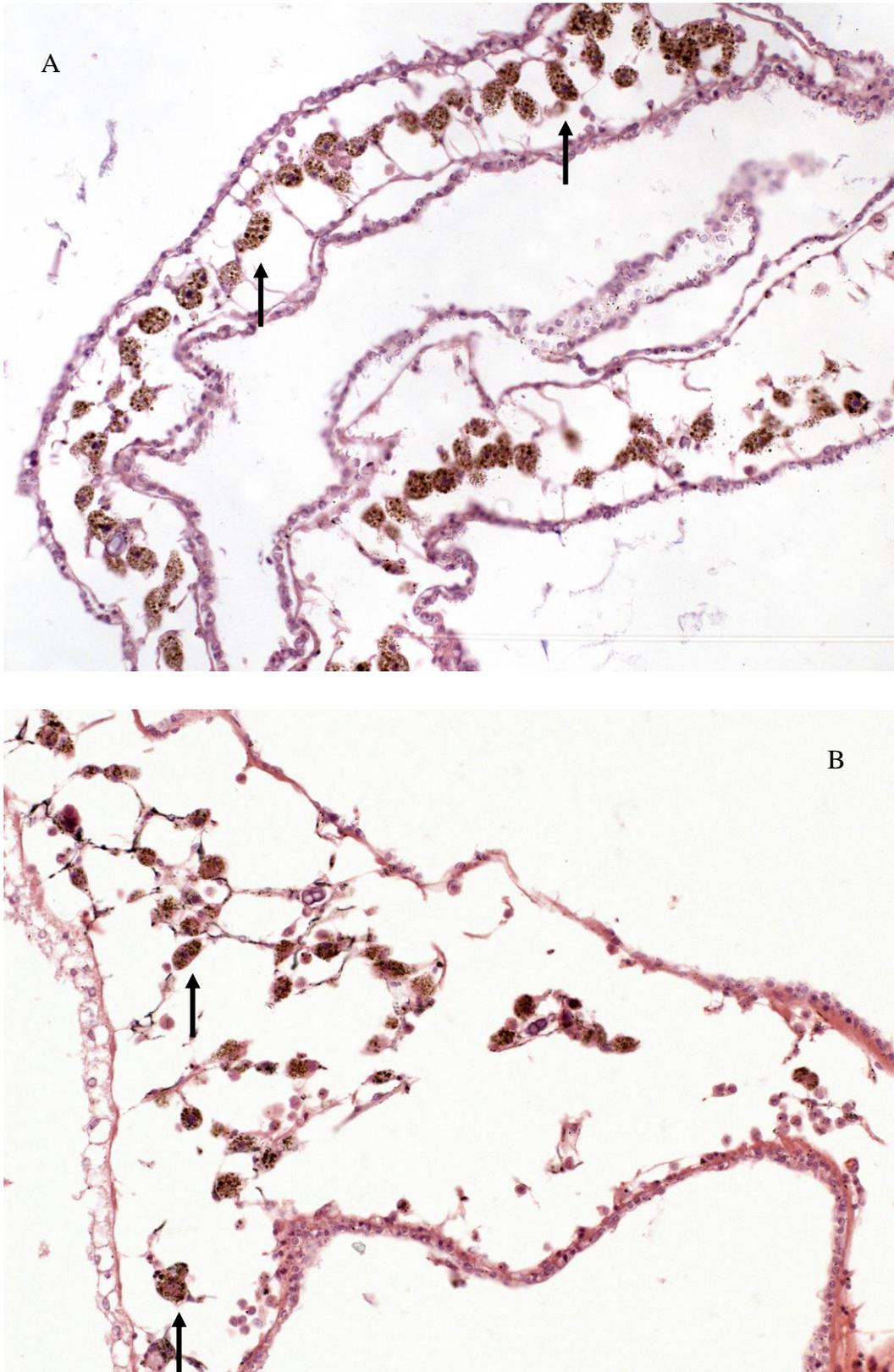


Fig. 28. A: células reticulares em moluscos com 20 dias de infecção (setas). Em B, células reticulares (setas) em moluscos com 30 dias de infecção. HE. x25. Observar a diminuição do tamanho e da quantidade das células reticulares na crista renal em 30 dias de infecção quando comparadas com 20 dias de infecção.

Neste período, a forma evolutiva predominante foi o esporocisto-filho (Fig. 29), entretanto, muitos deles já em processo de diferenciação para cercária localizados na região da cavidade do manto (Fig. 30), cefalopodal (Fig. 31) e da crista renal (Fig. 32).



Fig. 29. Esporocisto-filho (seta) na região da crista renal em molusco com 30 dias de infecção. HE, x40.



Fig. 30. Esporocisto-filho (seta) na região da cavidade do manto em processo de diferenciação com o aparecimento das glândulas de penetração em molusco com 30 dias de infecção. HE, x63.



Fig. 31. Processo de diferenciação do esporocisto-filho em estrutura semelhante à cercaria (seta) na região cefalopodal de molusco com 30 dias de infecção. HE, x40.

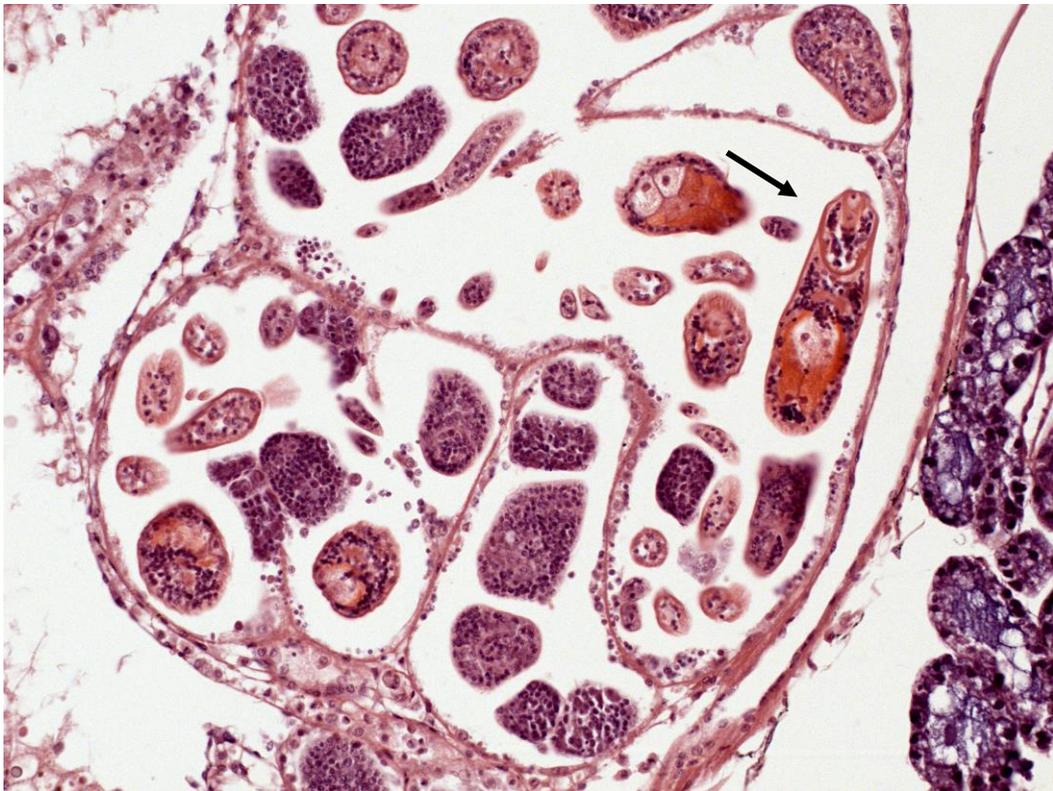


Fig. 32. Esporocistos-filho em diferenciação para formação de cercaria (seta) na região renal em molusco com 30 dias de infecção. HE, x25.

Os hemócitos foram encontrados mais freqüentemente ao redor dos granulomas bacterianos nos grupos dos infectados não sendo vistos nos granulomas do grupo controle. Em relação aos hemócitos livres na circulação, não houve grande diferença na quantidade dessas células no grupo com 10 dias de infecção quando comparados o grupo controle sendo que o primeiro apresentou um aumento discreto em relação ao último. No grupo com 20 dias de infecção foi notado um maior aumento quando comparado ao grupo controle e ao grupo com 10 dias de infecção, sendo inclusive encontrado um sítio de proliferação hemocitária. No último grupo analisado, 30 dias de infecção, os resultados do encontro dos hemócitos podem ser comparados aos do grupo controle.

Durante a leitura das lâminas as formas evolutivas de esporocisto-mãe (I), esporocisto-filho (II) e cercária foram encontradas mais freqüentemente na região cefalopodal, cavidade do manto e região da crista renal. Apesar da não notificação através das fotografias as formas evolutivas foram observadas nas glândulas digestivas (hepatopâncreas) e ovotéstis.

4.4 Colorações Especiais

Foram realizadas colorações diferenciais para identificação do material armazenado pelas células reticulares pigmentares, assim como, para observação das estruturas englobadas pelos granulomas e, por fim, mostrarmos a composição dos granulomas, uma vez que, nos resultados descritos neste trabalho, os granulomas não apresentaram colágeno em sua composição.

4.4.1 Coloração de PERL'S

Com 10 dias de infecção, as células seguem o padrão de enfileiramento e é possível notar a grande quantidade de pigmento férrico e melânico corado em azul pela coloração de Perl's (Fig. 33).

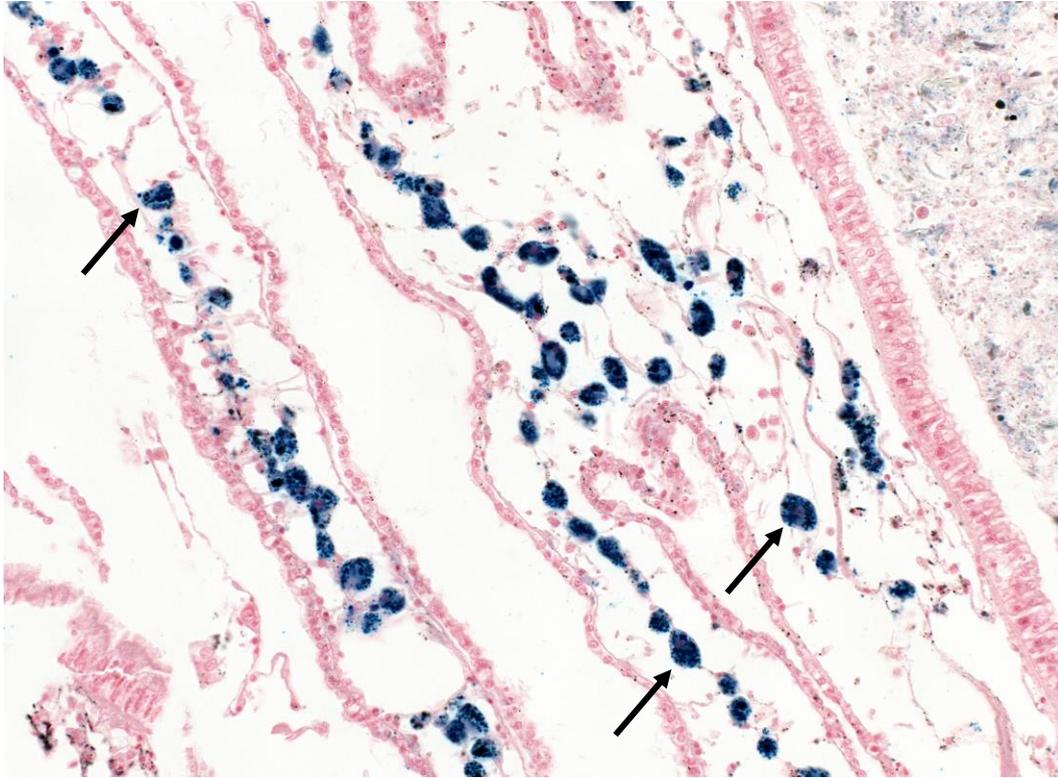


Fig. 33: Células reticulares (setas) na crista renal coradas por Perl's exibindo grande quantidade de ferro no molusco com 10 dias de infecção. x25.

Com 20 dias de infecção ocorreu um aumento na quantidade de células reticulares, como citado anteriormente e, portanto, foi possível observar uma quantidade maior de pigmento férrico e melânico (Fig. 34).

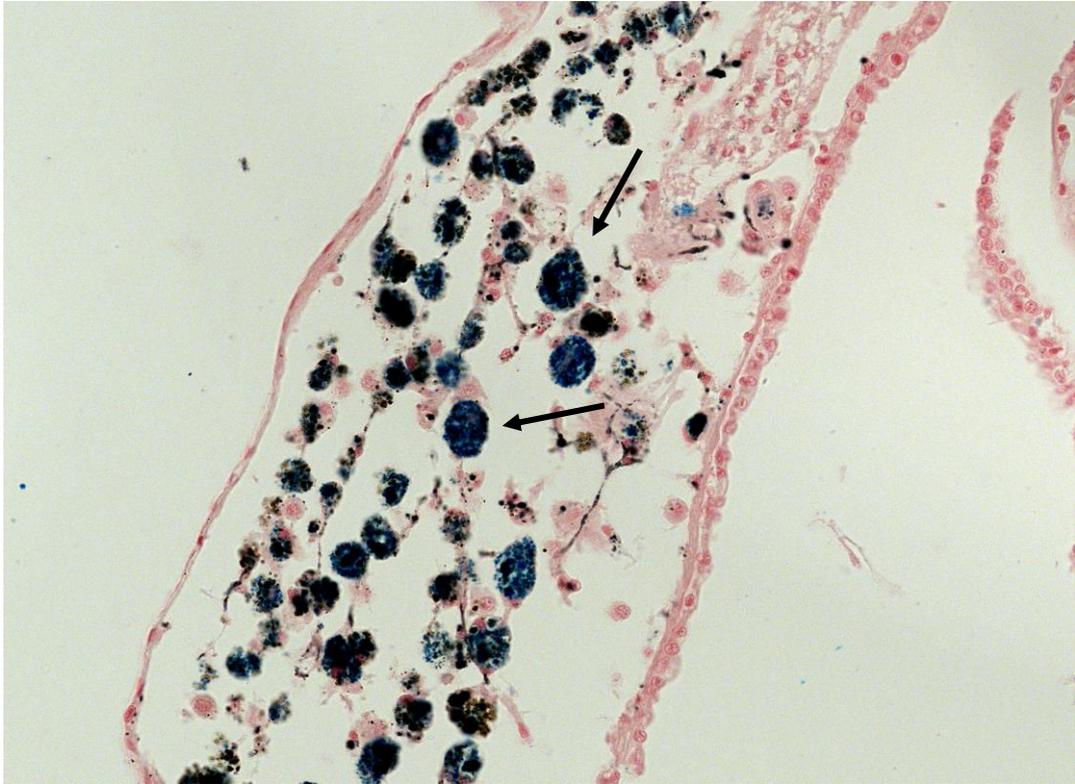


Fig. 34. Presença de pigmento férrico e melânico (setas) nas células reticulares coradas com Perl's em molusco com 20 dias de infecção. x40.

Com 30 dias de infecção, apesar da diminuição na quantidade de células reticulares como observado anteriormente, foi detectado a presença do pigmento férrico e melânico (Fig. 35).

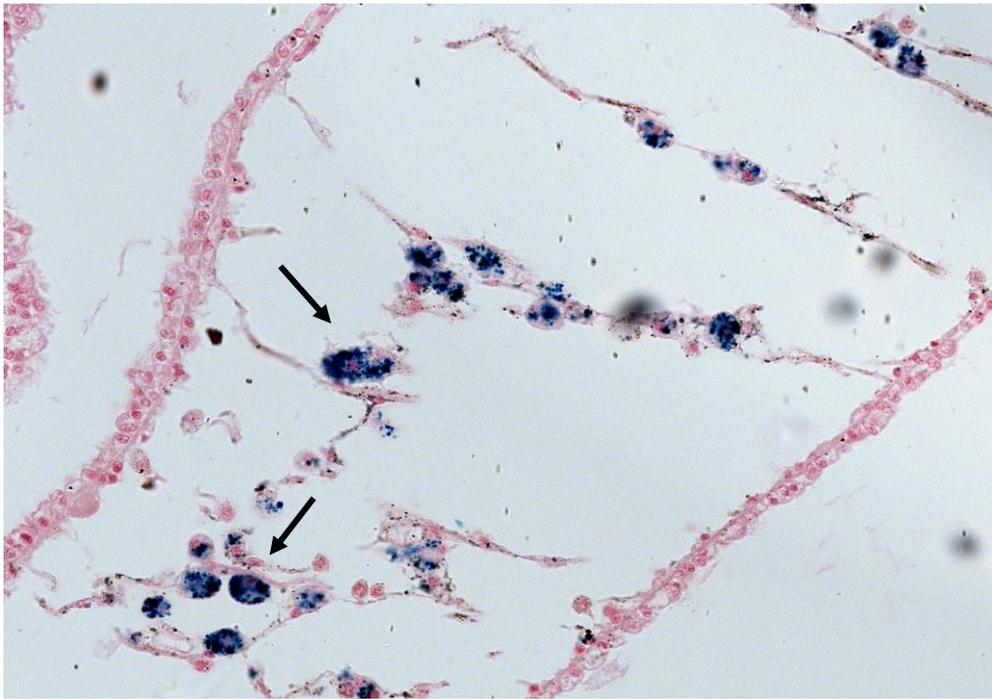


Fig. 35: Diminuição do número de células reticulares (setas) na crista renal coradas com Perl's em molusco com 30 dias de infecção. x40.

Neste período, 30 dias pós-infecção, foi observado que formas evolutivas como esporocisto secundário e cercárias não apresentaram células com pigmentos, mostrando que, nessa fase, não ocorre o combate do molusco às formas infectantes do parasito (Fig. 36).

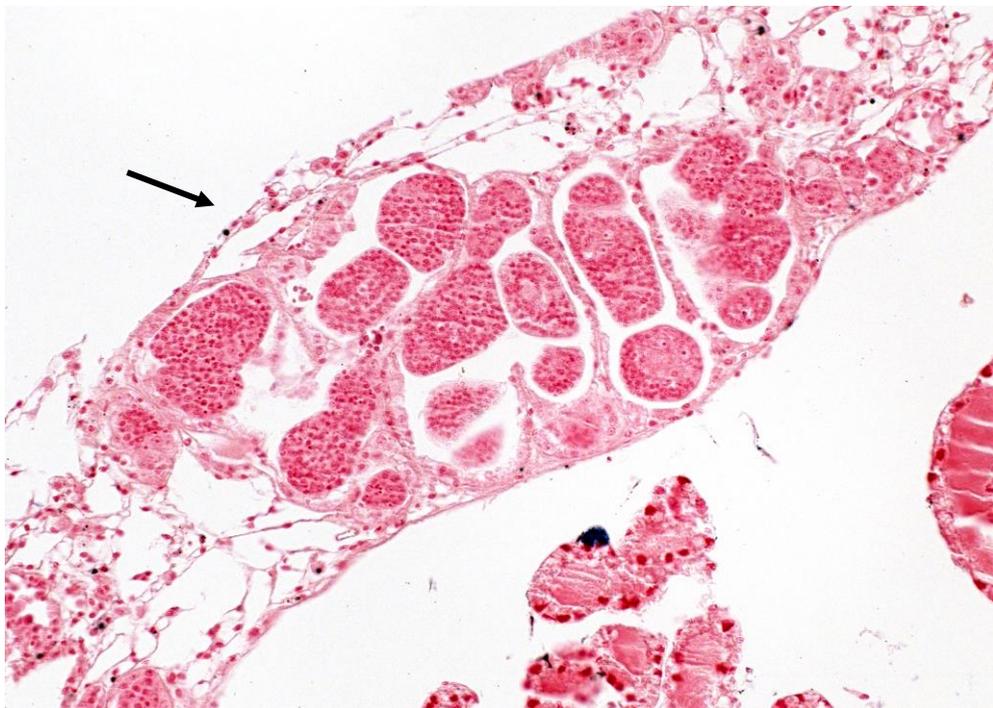


Fig 36: Esporocisto-mãe em diferenciação em esporocistos-filhos (seta) sem evidências de ferro. Perl's. x63.

4.4.2 Coloração de Giemsa

A coloração de giemsa foi utilizada para identificar as estruturas englobadas pelo granuloma formado no tecido dos moluscos. Nas figuras 37 e 38 observamos o englobamento de bactérias sem a presença do parasito, enquanto que na figura 39 observamos bactérias e esporocistos.

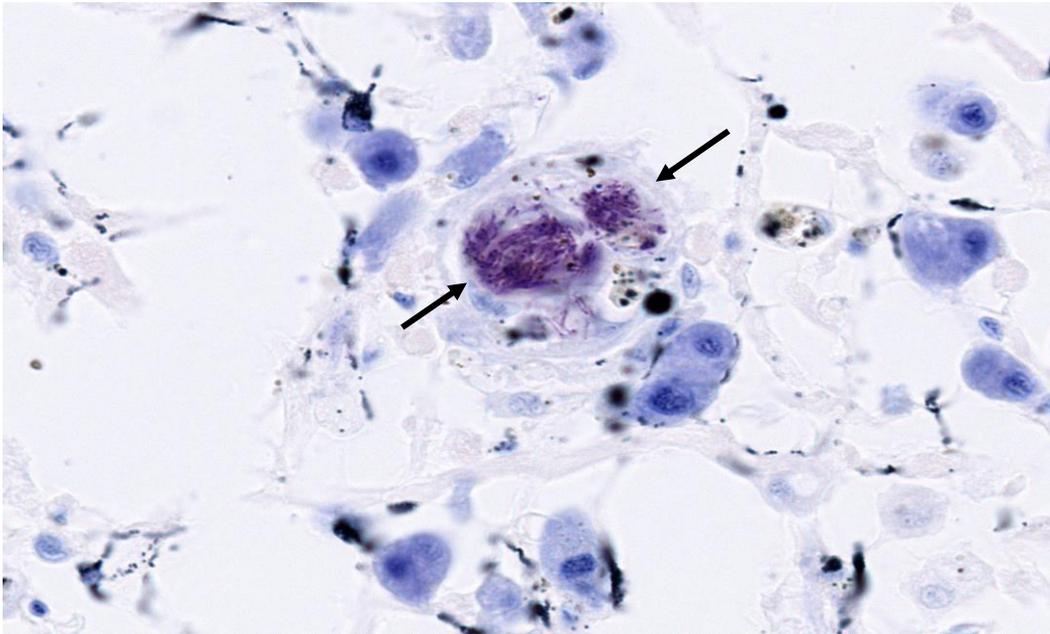


Fig. 37: Bactérias no interior do granuloma (setas) em molusco com 20 dias de infecção. Giemsa, x100.

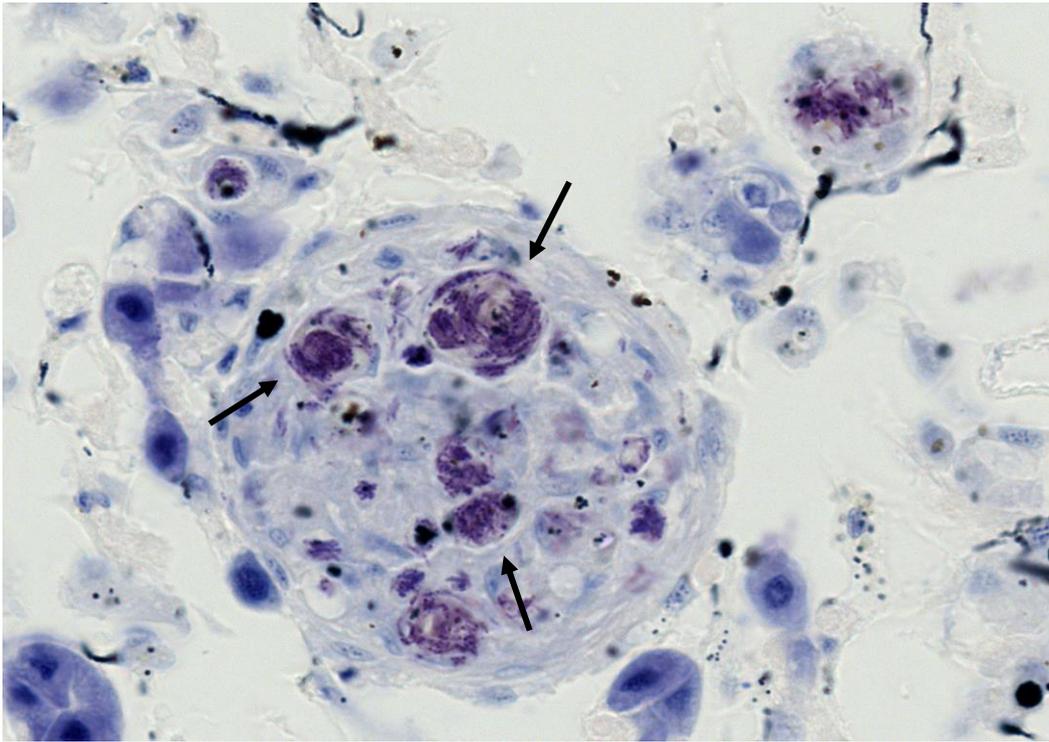


Fig. 38: Bactérias no interior do granuloma (setas) em molusco com 20 dias de infecção. Giemsa. x100.

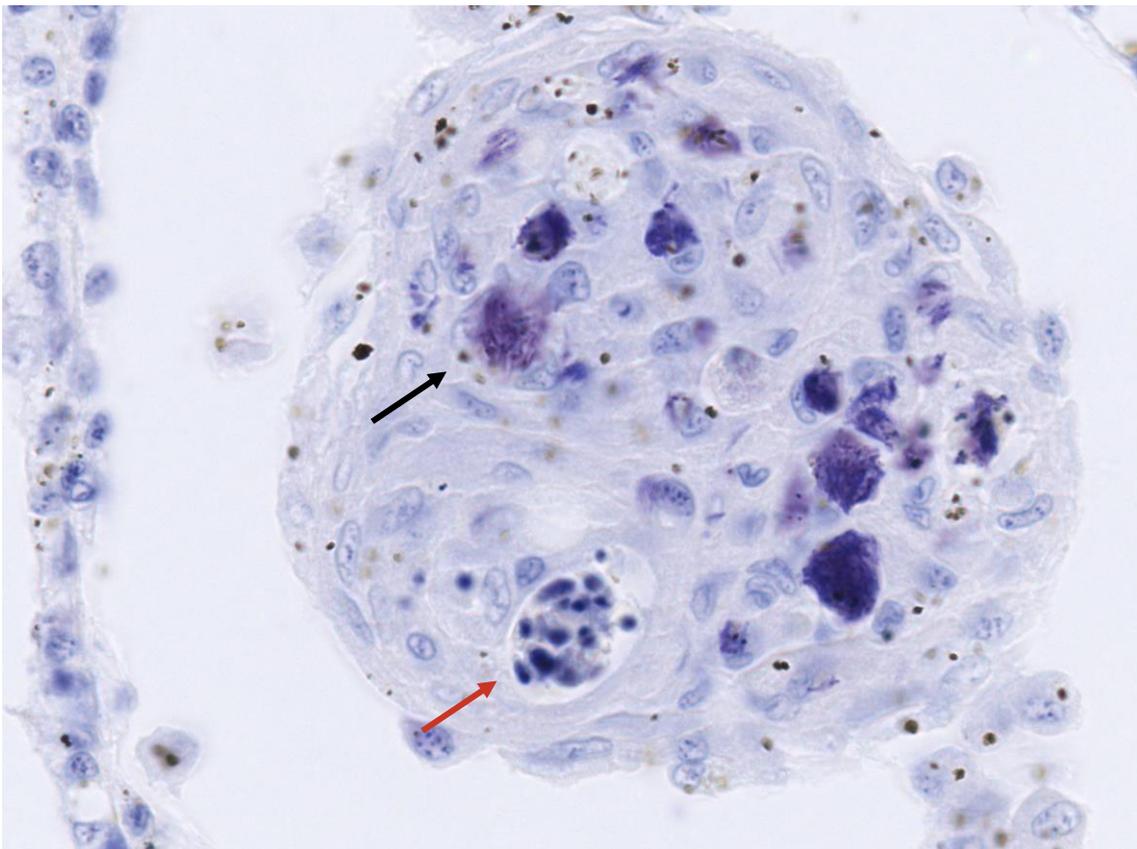


Fig. 39: Granuloma com bactérias (seta preta) e esporocisto (seta vermelha), em seu interior em molusco com 20 dias de infecção. Giemsa, x100.

4.4.3 Coloração de PMA Picro-sirius

A coloração de PMA Picro-sirius foi utilizada para determinar a presença ou ausência de colágeno quando notificada pela leitura em microscopia confocal. Observamos a trama de colágeno (corada em vermelho) e as células reticulares pigmentares (coradas em verde) como mostra a figura 40. Na figura 41 observamos a estrutura granulomatosa e constatamos que o colágeno não faz parte de sua composição. As duas figuras são de moluscos com 20 dias de infecção.

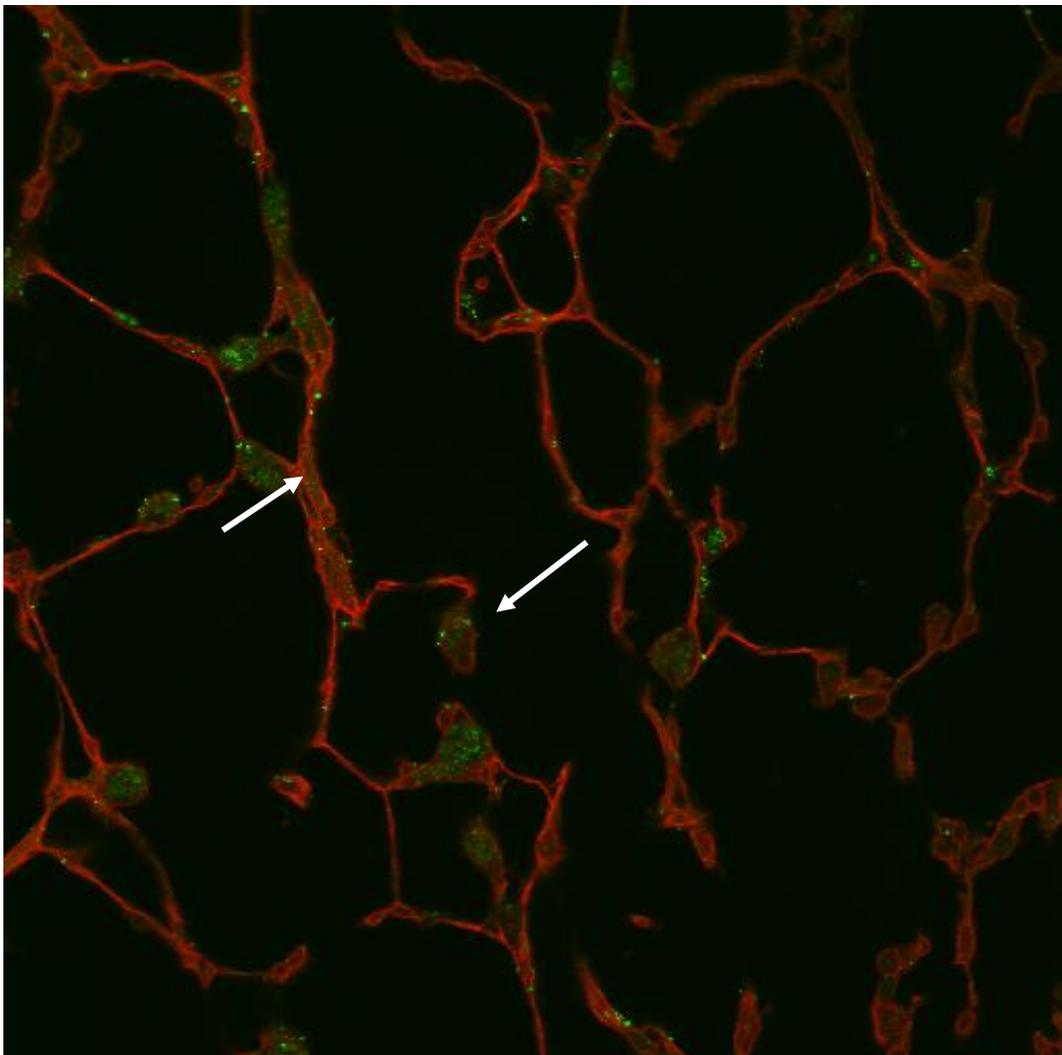


Fig. 40: Crista renal mostrando colágeno (vermelho) e pigmento férrico (verde) corados pelo PMA Picro-sirius (setas) em molusco com 20 dias de infecção. x1024.

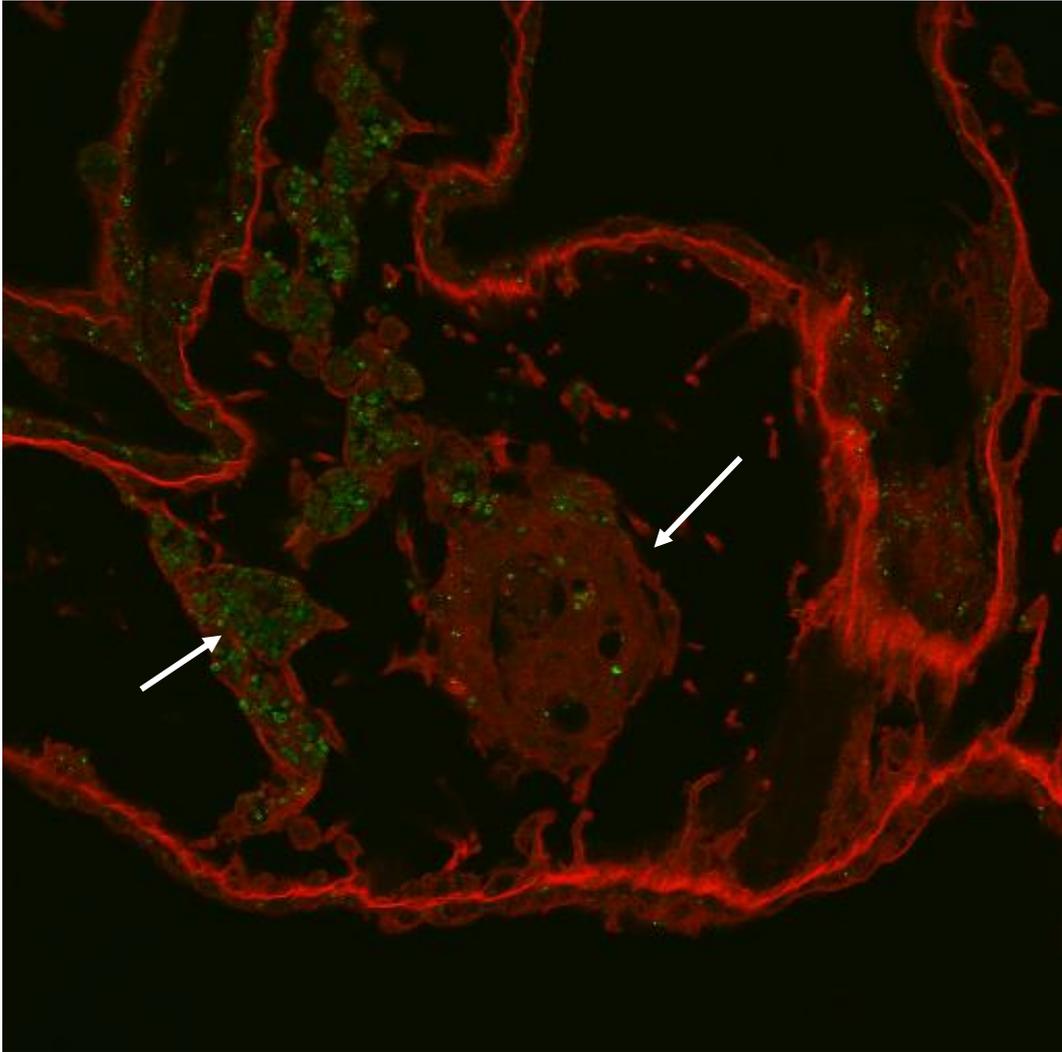


Fig. 41: Observar a estrutura granulomatosa (seta) sem a presença de colágeno. Ao lado, células reticulares coradas de verde (seta) em moluscos com 20 dias de infecção. PMA Picro-sirius. x1024.

4.4.4 Demais colorações

Apesar da notificação através de fotografias de apenas três colorações, todas as outras foram realizadas e observadas quanto ao encontro das substâncias por elas coradas. Ao analisar as lâminas coradas com Von Kossa foram encontradas gotículas de cálcio por todo o corpo do molusco com mais frequência na região do manto; a Tricromática de Masson foi positiva para o encontro de prata reticulina; já o PAS- Alcian Blue mostrou-se positivo para conjuntivo, enquanto que o Fontana-Masson mostrou que as células reticulares pigmentares são formadas por dois tipos de pigmentos diferentes: o melânico e o férrico. Este último positivo na coloração de PERL'S.

4.5 Alterações patológicas nos três períodos analisados.

4.5.1 Granulomas

Os granulomas foram encontrados nos três períodos analisados tendo ocorrido em maior quantidade com 20 e 30 dias de infecção (Fig. 42). Quando da coloração pelo Giemsa foi possível observar que das 19 lâminas observadas apenas 2 apresentaram granulomas com esporocistos, sendo as demais todas formadas por granulomas bacterianos.

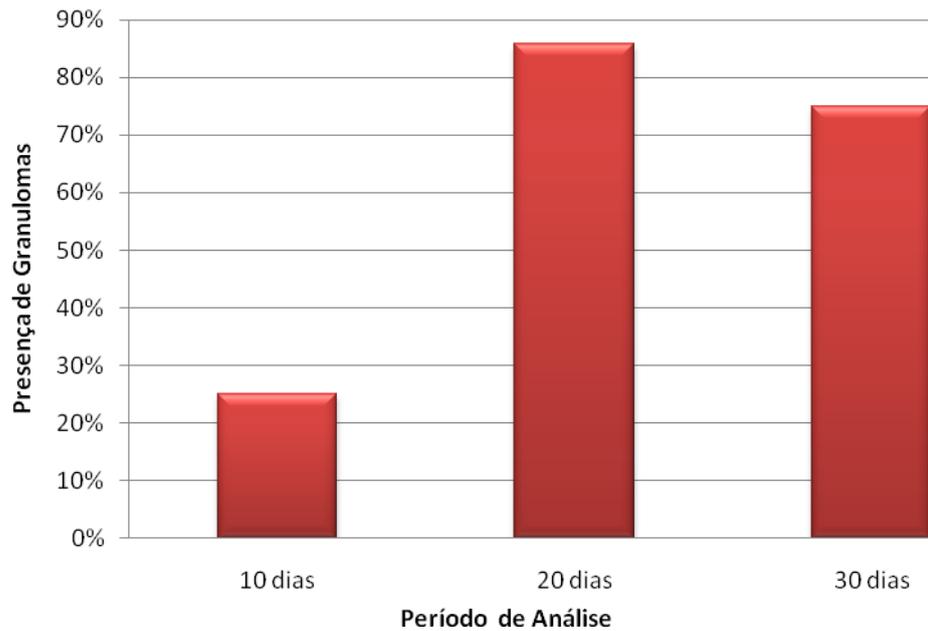


Figura 42: Presença de granulomas bacterianos em animais infectados durante os três períodos de análise. Com 10 dias de infecção foram analisadas 7 lâminas; com 20 dias o total de lâminas analisadas foi 7 e com 30 dias de infecção foram analisadas 4 lâminas.

4.5.2 Formas evolutivas

Durante o processo de infecção foram encontradas três formas evolutivas do *S. mansoni* nos moluscos. No primeiro período de análise (10 dias de infecção), a forma evolutiva encontrada foi o esporocisto I. Com 20 dias de infecção (segundo período de análise) foram encontrados os esporocistos II também chamados esporocistos-filhos ou secundários. No último período de análise (30 dias de infecção) foram evidenciados tanto esporocisto II quanto cercárias. Em torno de 25% das lâminas observadas foi possível evidenciar a presença das formas evolutivas do parasito, como mostra a figura 43.

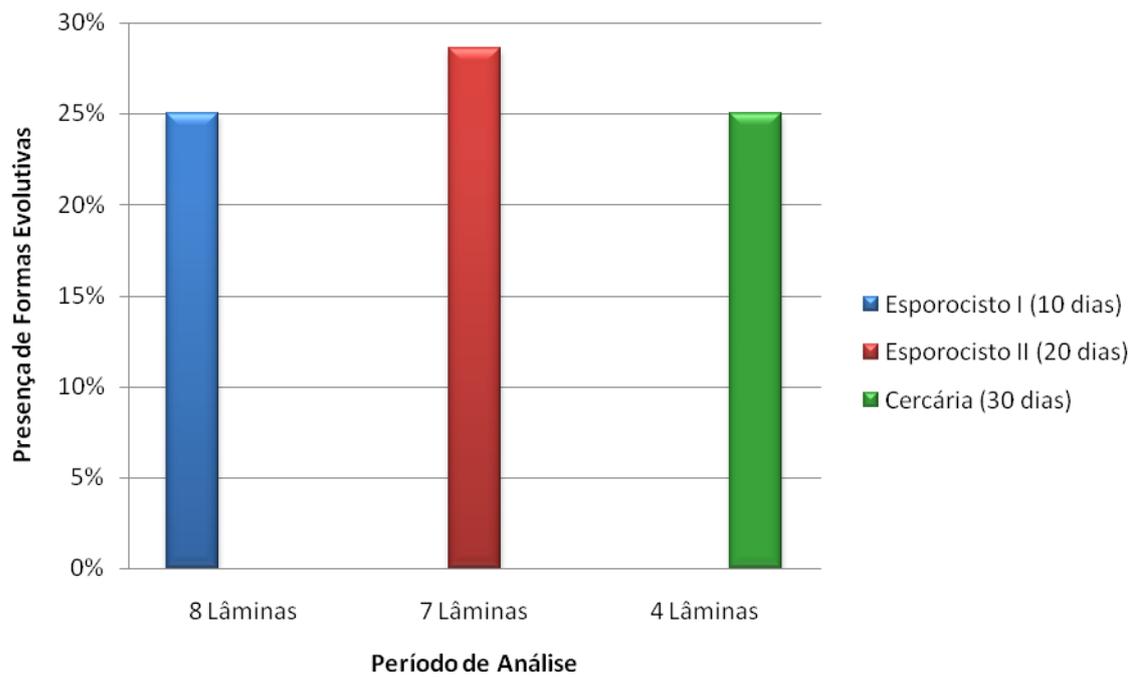


Figura 43: Presença de formas evolutivas durante os três períodos de análise no total de lâminas observadas. Com 10 dias de infecção foram analisadas 7 lâminas; com 20 dias o total de lâminas analisadas foi 7 e com 30 dias de infecção foram analisadas 4 lâminas.

5 DISCUSSÃO

Desde a década de 70, a Organização Mundial de Saúde (OMS), criou o Programa Especial para a Investigação e Formação em Doenças Tropicais (TDR), segmentando seis doenças para intenso estudo devido as suas enormes significâncias para a saúde pública. Destas (Malaria, Esquistossomose, Leishimaniose, Doença de Chagas, Filariose e Hanseníase), o agente causal de cinco delas envolve o hospedeiro intermediário invertebrado no seu ciclo de vida (KNIGHT; ONGELE; LEWIS, 2000).

Biomphalaria glabrata é altamente susceptível a infecção pelo miracídio do *Schistosoma mansoni* e representa o melhor hospedeiro intermediário para que o trematoda se desenvolva em áreas do nordeste e sudeste do Brasil (SOUZA *et al.*, 1997).

O sucesso do estabelecimento da infecção por larva de trematoda é dependente da susceptibilidade do hospedeiro e da infectividade do parasito (LOKER; BAYNE; YUI, 1986).

Durante a interação entre as formas larvais de *S. mansoni* e seu hospedeiro intermediário *B. glabrata* a principal função é desenvolvida por células fagocíticas móveis, os hemócitos, que são comparadas com os macrófagos dos vertebrados (BORGES; AZEVEDO; ANDRADE, 2006). No presente trabalho, os hemócitos são encontrados em grande número nos moluscos infectados embora eles também estejam presentes no molusco controle (não infectado).

Dentre as células envolvidas na defesa contra o parasito encontram-se, ainda, as células reticulares que são consideradas verdadeiras células fagocíticas que ingerem uma grande variedade de partículas estranhas (VAN DER KNAAP; LOKER, 1990). Em nosso estudo, essas células foram encontradas por todo o corpo do molusco tanto no hospedeiro não infectado quanto no hospedeiro infectado. Sendo as células reticulares dendríticas observadas, apenas, em regiões musculares podendo estar ligada a função de locomoção, por exemplo, uma vez que ela foi encontrada em grande quantidade da região do pé.

Os vertebrados heterotérmicos possuem centros melanomacrófagos que são grupos de células contendo pigmentos. Em peixes eles estão normalmente localizados no estroma de tecidos hematopoiéticos do baço e do rim e em anfíbios, répteis e em alguns peixes eles são encontrados no fígado. A captura de ferro em doenças hemolíticas aparece como a função principal, mas a captura de antígenos, o seqüestro de produtos da degradação celular e materiais potencialmente tóxicos são outras funções descritas (AGIUS; ROBERTS, 2003).

Vários autores têm demonstrado que células contendo pigmentos também estão presentes no fígado de anfíbios e que essas células fazem parte da linhagem macrofágica (GALLONE *et al.*, 2002). Autores como David e Freytag (1963), descreveram corpúsculos semelhantes à ferritina em células de Kupffer em anfíbios (CORSARO *et al.*, 2000).

As células pigmentares presentes no fígado de peixes, anfíbios e répteis pertencem ao sistema pigmentar extracutâneo. Elas derivam das células de Kupffer e mostram atividade melanosintética. A extensão da pigmentação do fígado aparece correlatada com modificações funcionais na morfologia do fígado (BARNI *et al.*, 1999).

Através de microscopia convencional foram observados, no anfíbio *Xenopus laevis*, grânulos pigmentados de cor marrom e preta. Esses numerosos pigmentos pretos foram encontrados na pele dorsal e no interstício do baço, mas foram escassos na pele ventral, no fígado, e no tecido conjuntivo do pulmão (ZUASTI *et al.*, 1998).

Diferentemente do encontrado nos vertebrados, as células reticulares pigmentares dos invertebrados ainda não foram relatadas. Sua função não é bem definida, mas o aumento dessas células durante a infecção pode inferir que ela tenha uma função na defesa do molusco contra o parasito, como citado por alguns autores acima.

Em nosso estudo, encontramos uma distribuição ampla das células reticulares pigmentares nos moluscos não infectados. Quando comparados aos moluscos infectados, estes possuem uma distribuição mais intensa na região da crista renal como também na cavidade do manto embora não sabemos se existe hipertrofia e / ou hiperplasia celular.

Assim como o trabalho realizado por Zuasti *et al.* (1998), também observamos em nosso trabalho dois tipos de pigmentos. Um tipo foi formado por acumulações de pigmentos marrons escuros quando corados com HE e sendo positivos quando corados com Perl's. O segundo tipo de pigmento também possuía cor marrom quando corado com HE e foi positivo para o método de Fontana, específico para melanina. Esses dois tipos de pigmentos foram encontrados nas células reticulares pigmentares de *B. glabrata*.

No décimo dia da infecção, as células pigmentares reticulares comportam-se semelhantemente tanto no molusco não infectado quanto no molusco infectado, no que diz respeito à quantidade e ao padrão de distribuição chamado por nós de “padrão de enfileiramento”. No vigésimo dia da infecção ocorre um aumento considerável dessas células, principalmente nas regiões da crista renal e da cavidade do manto. As células encontram-se mais dispersas não seguindo o padrão de distribuição. No trigésimo dia de infecção ocorre uma volta à normalidade com diminuição no número de células e, conseqüentemente, na quantidade de pigmentos e no padrão de distribuição celular.

O fato do aumento do pigmento férrico acompanhar a evolução da infecção pode inferir que ele está ligado à defesa como encontrado nos vertebrados.

Não foram encontrados pigmentos nas formas evolutivas podendo assim estar ligados ao molusco.

A capacidade do molusco infectado em liberar cercárias é bem correlatada com a histopatologia. Em espécies susceptíveis, como *B. glabrata*, esporocistos e cercárias são observados em grande número. Por outro lado, moluscos resistentes eliminam algumas cercárias, exibindo proliferação hemocitária em muitos órgãos e tecidos, usualmente resultando em encapsulação de esporocistos e cercárias (LEMOS; ANDRADE, 2001).

Exames histopatológicos seqüenciais têm revelado que em alguns casos os miracídios infectados são destruídos alguns minutos a 24 horas após a penetração no molusco (BORGES; SOUZA; ANDRADE, 1998). No presente trabalho, observamos a evolução do miracídio a esporocisto I no 20º dia da infecção. Nos primeiros dez dias observamos, apenas, o aumento dos hemócitos e das células reticulares.

Em trabalho realizado por Pan (1965), moluscos expostos ao *S. mansoni* indicaram que alguns parasitos foram destruídos por resposta tecidual do hospedeiro em espécies de moluscos que são relativamente hospedeiros ruins.

Secções histológicas examinadas descobriram algumas formas parasíticas com variável grau de reação tecidual. A maior concentração de parasitos ocorreu na região da glândula digestiva e no ovotestis, mas também foram encontrados em outros tecidos do molusco. A reação do hospedeiro foi representada por infiltração hemocitária de pequena a moderada, usualmente difusa, e raramente focal ao redor de múltiplas formas de *S. mansoni*. Alguns esporocistos e cercárias em desenvolvimento foram encontrados sem nenhum sinal de reação do hospedeiro (BORGES; AZEVEDO; ANDRADE, 2006; AZEVEDO; BORGES; ANDRADE, 2006).

No estudo realizado por nós, os parasitos (esporocistos I) foram encontrados na região da crista renal e da cavidade do manto em vinte dias de infecção enquanto que em trinta dias de infecção as formas evolutivas predominantes foram os esporocistos II, alguns em diferenciação, localizados principalmente na cavidade do manto e na região cefalopodal. Não observamos reação do hospedeiro ao redor das formas evolutivas.

Em relação à infiltração hemocitária, observamos um maior aumento com vinte dias de infecção onde encontramos um centro de produção de hemócitos, dado esse que difere com o achado por Bezerra *et al.* (1997), que relatam uma diminuição celular com cinco horas de infecção.

Nenhum dos esporocistos-mãe com desenvolvimento normal provocou resposta tecidual. Esses organismos em degeneração foram cercados por acumulações de fibroblastos que não foram hipertróficos e que não podiam ser diferenciados de fibroblastos normais em áreas vizinhas corroborando com achados de Coelho (1957) e Godoy *et al.* (1997).

Esporocistos-filhos migraram para o tecido interlobular do hepatopâncreas 18 dias após a infecção, fazendo o seu caminho principalmente através do tecido frouxo da crista renal, e menos frequentemente do rim e das cristas centrais. Depois de quatro semanas de infecção, os esporocistos-filhos ocuparam quase toda a área do tecido conjuntivo interlobular do hepatopâncreas (PAN, 1965). No presente estudo, os esporocistos-filhos foram encontrados parasitando toda a extensão do corpo do molusco na fase de trinta dias de infecção.

Mudanças teciduais mínimas em hospedeiros susceptíveis foram descritas por Faust (1920) e por Agersborg (1924); eles suspeitaram que, pelo menos, algumas das mudanças histopatológicas descritas por eles foram alterações secretórias normais das glândulas hepáticas do hospedeiro (PAN, 1958). Pratt e Barton (1941) e Pratt e Lindquist (1943) reportaram modificações dos lóbulos hepáticos em moluscos infectados, mas não descreveram mudanças proliferativas. Newton (1952, 1954) reportou que granulomas foram produzidos ao redor da primeira geração de esporocistos-filhos de *S. mansoni* em amostras de *A. glabratus* (*B. glabrata*) que são hospedeiros susceptíveis, mas não foram encontradas reações em moluscos resistentes (PAN, 1965). Os granulomas encontrados em nossas análises não apresentavam proliferação ao redor de formas evolutivas.

Outras observações indicam que: (a) os esporocistos-mãe provocam resposta menor e não-específica em tecidos do hepatopâncreas; (b) os danos extensos são produzidos no hepatopâncreas devido ao crescimento expansivo dos esporocistos-filhos; (c) a extensa reação tecidual é desenvolvida pelas cercárias; e (d) a severa reação tecidual contribui para as alterações da arquitetura tecidual normal e para a morte dos hospedeiros infectados. O tecido conjuntivo vascular frouxo da crista renal, em particular, e do rim e das cristas centrais são os mais importantes sítios de amebócitos hipertofiadados (PAN, 1965).

Depois de 30 dias de infecção não ocorreu liberação de cercárias, mas a observação histológica encontrou numerosos esporocistos em muitas localizações, com e sem reação tecidual. A não diferenciação cercariana foi notada por todo o período (LEMOS; ANDRADE, 2001). No nosso estudo encontramos formas evolutivas em diferenciação ao final dos trinta dias de infecção, inclusive com o aparecimento das glândulas de penetração, apesar de não encontrarmos cercárias já diferenciadas.

Segundo Godoy *et al.* (1997), em trabalho realizado com moluscos *B. glabrata* expostos ao *S. mansoni* e examinados um mês após a infecção, os hospedeiros exibiram esporocistos em vários estágios de desenvolvimento incluindo algumas cercárias maduras, com disseminada distribuição em muitos órgãos e tecidos, com alguns exemplares sem sinal de reação tecidual e outros com áreas exibindo forte proliferação e infiltração de hemócitos, alguns deles sendo acumulados e formando estruturas semelhantes a granulomas contendo esporocistos desintegrados em seus centros. Em nosso estudo ocorreu pequena infiltração hemocitária e as estruturas granulomatosas foram responsáveis por digerir bactérias e não formas evolutivas do *S. mansoni*.

No mesmo trabalho, Godoy *et al.* (1997), encontraram que reações focais frequentemente assumem aparência de granuloma. Lesões encapsulantes foram especialmente proeminentes nas porções tubular e sacular dos rins. Eles também foram observados no tecido conjuntivo na borda da cavidade do manto, mas foram raros no pé e nas áreas da porção anterior do molusco. Essas reações foram formadas por hemócitos, fibrilas e fibras concêntricamente dispostas ao redor de uma área central onde alguns grânulos basofílicos pequenos e irregulares são vistos. A distribuição dos granulomas, em nosso estudo, se deu por todo o corpo do molusco, tanto nos exemplares não infectados, quanto nos infectados.

Em nosso estudo, os granulomas não foram formados por colágeno diferentemente do encontrado por Lemos (1999), que relatou a presença de fibras com características de colágeno apesar de o autor afirmar que existem controvérsias sobre a presença dessas fibras.

A distribuição das formas evolutivas do parasito, em nosso estudo, esporocisto I, esporocisto II e cercárias, foram observadas em vários órgãos sendo os mais parasitados a região cefalopodal, cavidade do manto, glândulas digestivas e ovotestis.

6 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos, chegamos às seguintes conclusões:

- Duas categorias de células são encontradas tanto nos moluscos não infectados quanto nos infectados. Uma delas aparece predominantemente no músculo e foi chamada de célula dendrítica pigmentar. A outra possui uma distribuição ampla por todo o corpo do molusco e é chamada de célula reticular pigmentar;
- Com 10 dias de infecção não ocorreu visualização de parasito, apenas de estruturas granulomatosas. As células reticulares apresentaram um aumento discreto em relação ao molusco não infectado seguindo o padrão de enfileiramento;
- Com 20 dias de infecção a forma evolutiva predominante foi o esporocisto-mãe (esporocisto I). As estruturas granulomatosas continuavam presentes. Ocorreu um aumento considerável tanto de células reticulares quanto de hemócitos e o padrão das células reticulares se apresentou disperso.
- Ao final de 30 dias de infecção a forma evolutiva foi o esporocisto-filho (esporocisto II) e formas em diferenciação. As células reticulares e os hemócitos diminuíram na circulação. As células reticulares voltaram a seguir o padrão de enfileiramento como se fosse uma volta a normalidade.
- As estruturas granulomatosas encontradas tanto no molusco não-infectado quanto nos moluscos infectados e estudados nos diferentes períodos apresentaram bactéria em seu interior e não possuíam colágeno em sua formação.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 580 p.

AGIUS, C.; ROBERTS, R. J. Melano-macrophage centers and their role in fish pathology. **Journal of Fish Diseases**, v. 26, p. 449-509, 2003.

AMARAL, R. S. (Org.); THIENGO, S. A. R. C. (Org.); PIERI, O. S. (Org.). **Vigilância e Controle de Moluscos de Importância médica: Diretrizes técnicas**. 2. ed. Brasília: Editora MS, 2008. 178 p.

AZEVEDO, C. M.; BORGES, C. C.; ANDRADE, Z. A. Behavior of *Schistosoma mansoni*-induced histopathological lesions in *Biomphalaria glabrata* submitted to ionizing radiation. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 3, p. 218-221, 2004.

_____. Changes induced in *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) following trials for artificial stimulation of its internal defense system. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 10 (Suppl. 1), p. 199-203, 2006.

BARNES, R. S. K.; CALOU, P.; OLIVER, P. J. W. **Os Invertebrados**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2007. 504 p.

BARNI, S.; BERTONE, V.; CROCE, A. C.; BOTTIROLI, G.; BERNINI, F.; GERZELI, G. Increase in liver pigmentation during natural hibernation in some amphibians. **Journal of Anatomy**, v. 195, p. 19-25, 1999.

BARROS-COELHO, R. Patologia da esquistossomose mansônica. 1. Comportamento patogênico do ovo do *Schistosoma mansoni*. **Publicações avulsas do Instituto Aggeu Magalhães**. v. 4, p. 61-71, 1955.

BASTOS, O. C.; SCHIAVOTELO, R. J. G.; RIBEIRO, M. L. J. F. Suscetibilidade de *Biomphalaria tenagophila* do Estado de São Paulo à infecção por linhagens de *Schistosoma mansoni* da baixada maranhense (Maranhão, Brasil). **Revista de Saúde Pública**, v. 18, p. 355-358, 1984.

BAYNE, C. J.; BUCKLEY, P. M.; DEWAN, P. C. Macrophagelike Hemocytes of Resistant *Biomphalaria glabrata* are cytotoxic for Sporocysts of *Schistosoma mansoni* in Vitro. **Journal of Parasitology**, v. 66, n. 3, p. 413-419, 1980.

BAYNE, C. J. Molluscan immunobiology. In: SALEUDDIN, A. S. M.; WILBUR, K. M. (Ed.). **The Mollusca**, v. 5. Physiology. Part. 2. New York, Academic Press, p. 407, 1983.

BEZERRA, F. S. M.; NOGUEIRA-MACHADO, J. A.; CHAVES, M. M.; MARTINS, R. L.; COELHO, P. M. Z. Quantification of the population and phagocytary activity of hemocytes of resistant and susceptible strains of *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria tenagophila* infected with *Schistosoma mansoni*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**. v. 39, n. 4, p. 197-201, 1997.

BEZERRA, F. S. M. Moluscos transmissores do *schistosoma mansoni*. In: NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 213-221.

BOGLIOLO, L. Patologia. **Revista Brasileira de Malariologia**. v. 11, p. 359-424, 1959.

BORGES, C. M. C; AZEVEDO, C. M; ANDRADE, Z. A. A contribution to the pathobiology of *Biomphalaria glabrata* hemocytos. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, suppl. 1, p. 193-198, 2006.

BORGES, C. M. C; SOUZA, C. P; ANDRADE, Z. A. Histopathologic features associated with susceptibility and resistance of *Biomphalaria* snails to infection with *Schistosoma mansoni*. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, suppl. 1, p. 117-121, 1998.

BOROS, D. L. Immunopathology of *Schistosoma mansoni* infection. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 2, p. 250, 1989.

BRUSCA, R. C.; BRUSCA, G. J. **Invertebrates**. 2. ed. Sunderland, Massachussets:, Sinauer Associates, 2003.

CHENG, T. C.; GARRABRANT, T. A. Acid phosphatase in granulocytic capsules formed in strains of *Biomphalaria glabrata* totally and partially resistant to *Schistosoma mansoni*. **Internacional Journal Parasitology**. v. 7, p. 467-472, 1977.

CHERNIN, E. Behavioral responses of miracidia of *Schistosoma mansoni* and other trematodes to substances emitted by snail. **Journal of Parasitology**, v. 56, p. 287-296, 1970.

_____. Penetrative activity of *Schistosoma mansoni* miracidia stimulated by exposure to snail-conditioned water. **Journal of Parasitology**, v. 58, p. 209-212, 1972.

_____. Some host-findings attributes of *Schistosoma mansoni* miracidia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 23, p. 320, 1974.

CHERNIN, E.; ANTOLICS, V.M. Penetrative capacity of *Schistosoma mansoni* miracidia. **Journal of Parasitology**, v. 63, p. 560-561, 1975.

COELHO, J. R.; BEZERRA, F. S. M. Compatibility of *Biomphalaria tenagophila* with *Schistosoma mansoni*: a study of homologous plasma transference. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 1, p. 111-112, 2006.

COELHO, M. V. Aspectos do desenvolvimento de formas larvárias de *Schistosoma mansoni* em *Australorbis nigricans*. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 17, p. 325-337, 1957.

_____. O parasito: *Schistosoma mansoni*. In: CUNHA, S. (Org.). **Esquistossomose mansoni**. São Paulo: Universidade de São Paulo, p. 1-9, 1970.

COELHO, P. M. Z. Relação molusco-parasita. In: Barbosa, F. S. (Org.). **Tópicos em malacologia médica**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1995. p. 203.

COELHO, P. M. Z.; CARVALHO, O. S.; ANDRADE, Z. A.; MARTINS-SOUSA, R. L.; ROSA, F.M.; BARBOSA, L.; PEREIRA, C. A. J.; CALDEIRA, R. L.; JANNOTTI-PASSOS, L. K.; GODARD, A. L. B.; MOREIRA, L. A.; OLIVEIRA, G. C.; FRANCO, G. R.; TELES, H. M. S.; NEGRÃO-CORRÊA, D. *Biomphalaria tenagophila/Schistosoma mansoni* interaction: premises for a new approach to biological control of schistosomiasis. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 109-111, 2004.

COELHO, P. M. Z.; CARVALHO, O. S.; LENZI, H. L. (Org.). **Schistosoma mansoni & Esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2008. 1124p.

CORSARO, C.; SCALIA, M.; LEOTTA, N.; MONDIO, F.; SICHEL, G. Characterisation of Kupffer cells in some Amphibia. **Journal of Anatomy**, v. 196, p. 249-261, 2000.

FEACHEM, R. G.; BRADLEY, D. J.; GARELICK, H.; MARA, D. D. **Sanitation & diseases, Schistosoma and schistosomiasis**. Chichester: John Wiley, 1983. Chapt. 32.

FERRARI, M. L. A.; COELHO, P. M. Z.; ANTUNES, C. M. F.; TAVARES, C. A. P.; CUNHA, A. S. Efficacy of oxamniquine and praziquantel in the treatment of *Schistosoma mansoni* infection: a controlled trial. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 81, n. 3, p. 190-196, 2003.

FRAGA DE AZEVEDO, J.; CARVÃO GOMES, F. A.; BRAGANÇA, G. F. M.; BAPTISTA, A. M.; MAGALHÃES, E. M. Application of radioisotopes to the study of the metabolism of fresh-water snails (Gastropoda-Pulmonata). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 7, p. 84-89, 1958.

GALLONE, A.; GUIDA, G.; MAIDA, I. CÍCERO, R. Spleen and liver pigmented macrophages of *Rana Esculenta* L. A new melanogenic system? **Pigment Cells Research**, v. 15, p. 32-40, 2002.

GODOY, A.; SOUZA, C. P.; GUIMARÃES, T.; ANDRADE, Z. A. Unusual Histological Findings in *Biomphalaria glabrata* with High Degree of Resistance to *Schistosoma mansoni* Miracidia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 1, p. 121-122, 1997.

GUARALDO, A. M. A.; MAGALHÃES, L. A.; RANGEL, H. A.; PAREJA, G. Evolução dos esporocistos de *Schistosoma mansoni*, 1907 em *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), e *Biomphalaria tenagophila* (D'Orbigny, 1835). **Revista Saúde Pública**, v. 15. p. 436-448, 1981.

HENEINE, I. F.; GAZZINELLI, G.; TAFURI, W. L. Iron metabolism in the snail *Biomphalaria glabrata*: uptake, storage and transfer. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 28, p. 391-399, 1969.

KANAMURA, H. Y.; DIAS, L. C. S. Estudos de anticorpos IgM para vigilância epidemiológica da esquistossomose mansônica em área de baixa endemicidade. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 60, n. 1, p. 1-10, 2001.

KATZ, N.; PEIXOTO, S. V. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33. n. 3, P. 303-308, 2000.

KLOETZEL, K. Schistosomiasis in Brazil. Does social development suffice ? **Parasitology Today**. v. 5, p. 388-391, 1989.

KNIGHT, M.; ONGELE, E.; LEWIS, F. A. Molecular studies of *Biomphalaria glabrata*, na a intermediate host of *Schistosoma mansoni*. **International Journal for Parasitology**. v. 30, p. 535-541, 2000.

LEE, F. O.; CHENG, T. C. Incorporation of ⁵⁹Fe in the snail *Biomphalaria glabrata* parasitized by *Schistosoma mansoni*. **The Journal of Parasitology**, v. 58, n. 3, p. 481-488, 1972.

LEMOS, Q. T. Contribution to the histology of *Biomphalaria glabrata*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 4, p. 343-347, 1999.

LEMOS, Q. T.; ANDRADE, Z. A. Sequential Histological Changes in *Biomphalaria glabrata* during the course of *Schistosoma mansoni* Infection. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 5, p. 719-721, 2001.

LOKER, E. S.; BAYNE, C. J.; YUI, M. A. *Echinostoma paraensei*: hemocytes of *Biomphalaria glabrata* as targets of echinostome mediated interference with host snail resistance to *Schistosoma mansoni*. **Experimental Parasitology**, v. 62, p. 149-154, 1986.

MALDONADO, J. F.; ACOSTA-MATIENZO, J. Evolution del *Schistosoma mansoni* dentro de su hosped intermediário, el caracol *Australorbis glabratus*. **Puerto Rico Journal of Public Health and Tropical Medicine**. v. 22, p. 374-404, 1947.

MARCHALONIS, J. J.; SCHLUTER, S. F. Development of an Immune System. In: BECK, G.; COOPER, E. L.; HABICHT, G. S; MARCHALONIS, J. J. (Eds.). **Primordial immunity: Foundations for the vertebrate immune system**. New York: New York Academy of Sciences, 1994.

MOTT, K. E. Epidemiological considerations for development of a schistosome vaccine. **Acta Tropica**, v. 44, suppl. 12, p. 13-20, 1987.

MOORE, C. A.; EBLE, A. F. Cytochemical aspects of *Mercenaria mercenaria* hemocytes. **The Biological Bulletin**. v. 152, p. 105-119, 1977.

NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

NEWTON, W. L. The comparative tissue reaction of two strains of *Australorbis glabratus* to infection with *Schistosoma mansoni*. **Journal of Parasitology**. v. 38, p. 362-366, 1952.

_____. Tissue response to *Schistosoma mansoni* in second generation snails from a cross between two strains of *Australorbis glabratus*. **Journal of Parasitology**. v. 40, p. 352-355, 1954.

NOYA, B. A.; RUIZ-GUEVARA, R.; COLMENARES, C.; LOSADA, S.; NOYA, O. Low transmission áreas of schistosimiasis in Venezuela: consequences on the diagnosis, treatment, and control. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, suppl. 1, p. 29-36, 2006.

OLIVEIRA, C.; ZIERI, R. Pigmentação testicular em *Physalaemus nattereri* (Steindachner) (Amphibia, Anura) com observações anatômicas sobre o sistema pigmentar extracutâneo. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 22, n. 2, p. 454-460, 2005.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Preventive chemotherapy in human helminthiasis**: coordinated use of anthelmintic drugs in control interventions. A manual for health professionals and programme managers. Geneva: WHO, 2006. p. 71. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2006/9241547103_eng.pdf>. Acesso em: 23 março 2009.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Schistosomiasis**. A major public health problem. Geneva: WHO, 2008.

PAN, C. T. The general histology and topographic microanatomy of *Australorbis glabratus*. **Bulletin of the Museum of Comparative Zoology at Harvard College**, v. 119, n. 3, p. 237-299, 1958.

_____. Studies on the host-parasite relationship between *Schistosoma mansoni* and the snail *Australorbis glabratus*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 14, n. 6, p. 931-976, 1965.

PARAENSE, W. L. Fauna planorbídica do Brasil. In: LACAZ, C. S. **Introdução à geografia médica do Brasil**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1972. p. 213-239.

_____. Distribuição geográfica de vetores da xistossomose no Nordeste do Brasil. In: CONFERÊNCIA NACIONAL DE SAÚDE, 6, 1977. **Painel Programa Especial de Controle da Esquistossomose**. Brasília: Ministério da Saúde, 1977.

PARAENSE, W. L.; CORREA, L. R. Variation in susceptibility of populations of *Australorbis glabratus* to a strain of *Schistosoma mansoni*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 5, p. 15-22, 1963.

PASSOS, A. D. C.; AMARAL, R. S. Esquistossomose mansônica: aspectos epidemiológicos e de controle. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, supl 11, p. 61-74, 1998.

PEPE, M. S.; CARVALHO, O. S.; CALDEIRA, R. L.; PASSOS, L. K. J.; MÜLLER, G.; RODRIGUES, A. P.; AMARAL, H. L. C.; BERNE, M. E. A. Identificação de espécies de *Biomphalaria* (Gastropoda: *Planorbidae*) na Região Sul do Rio Grande do Sul, Brasil. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFPEL, 15., Pelotas, 2006. **Anais...** Pelotas: Ed. UFPEL, 2006.

PRATA, A. Comemoração do centenário da descoberta do *Schistosoma mansoni* no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 6, p. 689-691, 2008.

PRATT, I.; BARTON, G. D. The effects of four species of larval trematodes upon the liver and ovotestis of the snail, *Stagnicola emarginata angulata* (Sowerby). **Journal of Parasitology**, v. 27, p. 283-288, 1941.

PRATT, I.; LINDQUIST, W. D. The modification of the digestive gland tubules in the snail *Stagnicola* following parasitization. **Journal of Parasitology**, v. 29, p. 176-181, 1943.

RIBEIRO, P. J.; AGUIAR, L. A. K.; TOLEDO, C. F.; BARROS, S. M. O.; BORGES, D. R. Programa educativo em esquistossomose: modelo de abordagem metodológica. **Revista de Saúde Pública**, v. 38, n. 3, p. 415-421, 2004.

SANTOS, M. A. V.; BRABO, E. S.; CARNEIRO, B. S.; FAIAL, K. F.; RODRIGUES, I. R. C. Estudo quantitativo de metais presentes na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda), infectadas e não infectadas com *Schistosoma mansoni*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 2, p. 157-160, 2005.

SILVEIRA, A. C. Controle da esquistossomose no Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 84, suppl. 1, p. 91-104, 1989.

SMINIA, T.; VAN DER KNAAP, W. P. W. Immunorecognition in Invertebrates with Special Reference to Molluscs. In: BREHELIN, M. (Ed.). **Immunity in invertebrates**. Berlin: Springer Verlag, 1986. p. 112-124.

SOUZA, C. P.; LIMA, L. C. **Moluscos de interesse parasitológico do Brasil**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1990. p. 35-48.

VAN DER KNAAP, W. P.; LOKER, E. S. Immune mechanisms in trematode-snail interactions. **Parasitology Today**, v. 6, n. 6, p. 175-182, 1990.

VIANEY-LIAUD, M.; DUSSART, G. Starvato, dissecação and of allosperm in the hermaphrodite freshwater snail *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda, Pulmonata). **J. Mol. Study**, v. 60, p. 255-262, 1994.

YAGER, C. M.; HARRY, H. W. Uptake of heavy metal ions by *Taphius glabratus*, a snail host of *Schistosoma mansoni*. **Experimental Parasitology**. v. 19, p. 174-182, 1966.

ZELCK, U. E.; BECKER, W.; BAYNE, C. J. The plasma proteins of *Biomphalaria glabrata* in the presence e absence of *Schistosoma mansoni*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 19, p. 181-194, 1995.

ZUASTI, A.; JIMÉNEZ-CERVANTES, C.; GARCÍA-BORRÓN, J. C.; FERRER, C. The Melanogenic System of *Xenopus laevis*. **Archives of Histology and Cytology**, v. 61, n. 4, p. 305-316, 1998.

ZUIM, N. R. B.; ZANOTTI-MAGALHÃES, E. M.; MAGALHÃES, L. A.; LINHARES, A. X. Seleção genética de *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria tenagophila* visando à alteração da suscetibilidade e resistência ao *Schistosoma mansoni*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 5, p. 387-390, 2005.