

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

DISSERTAÇÃO

**Alterações locomotoras e reprodutivas em *Biomphalaria glabrata*
(SAY, 1818) (MOLLUSCA: PLANORBIDAE) hospedeiro
intermediário de *Schistosoma mansoni* SAMBON, 1907
(TREMATODA: SCHISTOSOMATIDAE) sob condições de estresse**

ANNA CARLA ALBERTO DA SILVA

2016



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO-
UFRRJ**

INSTITUTO DE VETERINÁRIA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**Alterações locomotoras e reprodutivas em *Biomphalaria glabrata*
(SAY, 1818) (MOLLUSCA: PLANORBIDAE) hospedeiro
intermediário de *Schistosoma mansoni* SAMBON, 1907
(TREMATODA: SCHISTOSOMATIDAE) sob condições de estresse**

ANNA CARLA ALBERTO DA SILVA

*Sob a Orientação da Professora Dra. Cláudia Portes Santos Silva e Coorientação da
Professora Dra. Clélia Christina Mello-Silva Almeida da Costa*

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

Seropédica, RJ

Outubro de 2016

636.089696

S586a

T

Silva, Anna Carla Alberto da, 1990-

Alterações locomotoras e reprodutivas em *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Mollusca: Planorbidae) hospedeiro intermediário de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 (Trematoda: Schistosomatidae) sob condições de estresse / Anna Carla Alberto da Silva. - 2016.

63 f.: il.

Orientador: Cláudia Portes Santos Silva.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, 2016.

Bibliografia: f. 53-62.

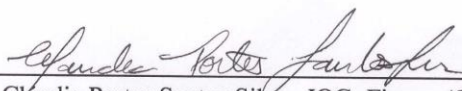
1. Parasitologia veterinária - Teses. 2. Molusco - Parasito - Teses. 3. Molusco - Reprodução - Teses. 4. Molusco - Locomoção - Teses. 5. Esquistossomose - Teses. 6. Moluscicidas - Teses. 7. Molusco como transmissor de doenças - Teses. 8. *Biomphalaria glabrata* - Teses. I. Silva, Cláudia Portes Santos, 1959- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

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

ANNA CARLA ALBERTO DA SILVA

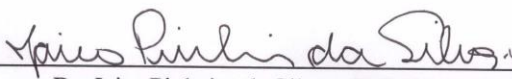
Dissertação submetida ao Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinária, como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre em Ciências.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM :03/10/ 2016

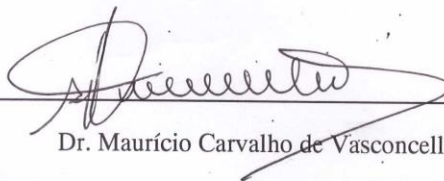


Dra. Cláudia Portes Santos Silva –IOC- Fiocruz/CPGCV-UFRRJ

(Orientadora)



Dr. Jairo Pinheiro da Silva –CPGCV-UFRRJ



Dr. Maurício Carvalho de Vasconcellos - IOC-Fiocruz

Dedico este trabalho a Deus, meu alvo.

AGRADECIMENTOS

É impossível chegar até aqui e não ter a quem agradecer. No meu caso o que não faltam são pessoas que foram simplesmente essenciais nesta conquista. Primeiramente quero agradecer ao meu Deus, autor e consumidor da minha fé que com sua infinita misericórdia tem escolhido me amar, abençoar e tornar meus sonhos realidade.

À minha guerreira de hoje e sempre, minha mãe Lêda Antônia Alberto que é meu ideal de vida e força. É ela que intercede por mim junto ao Pai e torna os meus dias mais fáceis e surpreendentemente alegres, me ensina, orienta e está ao meu lado para o que der e vier. Sou eternamente grata por ser sua filha.

Ao irmão mais divertido, Leonardo Alberto da Silva que me admira simplesmente pelo que sou e está ao meu lado para aconselhar. Você é o melhor maninho.

Ao meu namorado Welisson do Carmo Malaquias que com muita paciência tem entendido meus muitos momentos de ausência, tem me dado forças quando penso que não vou conseguir e tem escolhido viver ao meu lado e compartilhar comigo sonhos e realizações.

Aos meus amigos da igreja, tempos de escola, pré-vestibular, UERJ, intercâmbio, UFRRJ que tem se tornado amigos simplesmente da vida. Carlos Miranda, Larissa Rangel, Franciane, Juliana Godoy, Gisele da Gama Ramos, Agatha Vianna, Suellen por vibrarem a cada realização minha e torcer pelo meu crescimento profissional, pessoal, espiritual e emocional. Vocês fazem minha vida mais feliz.

À minha orientadora Dra. Cláudia Portes dos Santos Silva e coorientadora Dra. Clélia Christina Mello Silva Almeida da Costa do LAPSA/IOC/Fiocruz pela oportunidade de realizar o mestrado em Ciências Veterinárias na UFRRJ e por toda orientação e ensino.

Aos pesquisadores do LAPSA/IOC/Fiocruz em especial ao Dr. José Augusto dos Santos, Dr. Mauricio Vasconcellos, Rodolfo Cunha pela disponibilidade, gentileza e paciência em ajudar e tirar dúvidas.

Aos companheiros de laboratório Ronaldo Augusto, Gabriela Friani, Vanessa Santos, Laila, Ana Cristina pelos momentos de descontração e aprendizagem. Somos o futuro da pesquisa no Brasil. Em especial ao doutorando Everton dos Santos pela ajuda nas análises estatísticas.

Às meninas do alojamento da UFRRJ que com muito carinho me receberam e se mostraram disponíveis a me ajudar. Obrigada pelos momentos de descontração e conversas nos horários de refeições.

Aos professores, pesquisadores e demais funcionários do curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ por serem facilitadores do processo de Ensino-Aprendizagem, sendo assim fundamentais para o meu desenvolvimento acadêmico.

Ao CNPq, CAPES, FAPERJ, UFRRJ e Instituto Oswaldo Cruz pelo fomento ao projeto de pesquisa.

MUITO OBRIGADA!

Infelizmente a ciência, utilíssima, especialista em saber como as coisas funcionam, tudo ignora sobre o coração humano. É preciso sonhar para se decidir sobre o destino da navegação. Mas o coração humano, lugar dos sonhos, contrário da ciência, é coisa imprecisa. Disse certo poeta —Viver não é preciso. Primeiro temos o impreciso desejo de navegar. Só depois vem a precisa ciência de navegar.

Rubem Alves

BIOGRAFIA

ANNA CARLA ALBERTO DA SILVA, filha de José Carlos da Silva e Lêda Antônia Alberto, natural de Niterói/RJ, nasceu no dia 28 de janeiro de 1990.

Iniciou o Curso Normal no Instituto de Educação Professor Ismael Coutinho-IEPIC no ano de 2006 e finalizou em 2009.

Iniciou o curso de Ciências Biológicas na Universidade do Estado do Rio de Janeiro-UERJ, Faculdade de Formação de Professores-FFP no ano de 2010, graduando-se no ano de 2014.

Estagiou e foi bolsista de Iniciação Científica do CIEE no Laboratório de Esquistossomose Experimental/IOC/Fiocruz, no período de 2012 a 2013.

Foi selecionada no concurso interno da UERJ com bolsista de intercâmbio do programa PIMA para Universidade de Jaén na Espanha, no período de agosto de 2013 a fevereiro de 2014, onde estagiou no Laboratório de Nematologia do Departamento de Biologia Animal, Biologia Vegetal e Ecologia.

Atua desde 2010 como professora de Biologia no Pré-Universitário Popular Motivação- Projeto de Extensão da Universidade Federal Fluminense-UFF, sendo em 2013, convidada a participar da coordenação do mesmo.

Ingressou no mestrado do Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro-UFRRJ no ano de 2015, como bolsista do CNPq.

Participou como docente convidada na disciplina de Interação Parasito-Hospedeiro Intermediário do Programa de Pós-graduação *Lato sensu* em Especialização em Malacologia de Vetores do Instituto Oswaldo Cruz.

Em 2016 foi selecionada para o mestrado em Parasitologia na Universidade de Jaén- Espanha, pela bolsa de estudos da Fundación Carolina.

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO GERAL	01
1.1- <i>Biomphalaria glabrata</i> (Say, 1818) (Gastropoda: Planorbidae).....	01
1.1.1- Padrão locomotor de <i>Biomphalaria glabrata</i>	02
1.1.2- Padrão reprodutivo de <i>Biomphalaria glabrata</i>	04
1.2- <i>Schistosoma mansoni</i> Sambon, 1907	06
1.3- Esquistossomose mansônica.....	09
1.4- Moluscicida natural: o látex de <i>Euphorbia milii</i>	10
2- CAPÍTULO I- Mudanças no comportamento locomotor e reprodutivo de <i>Biomphalaria glabrata</i> infectada por <i>Schistosoma mansoni</i>	12
RESUMO	13
ABSTRACT	14
2.1- INTRODUÇÃO	15
2.2- MATERIAL E MÉTODOS	15
2.2.1- Nota ética.....	15
2.2.2- Infecção experimental.....	15
2.2.3- Atividade locomotora.....	16
2.2.4- Parâmetros reprodutivos.....	17
2.2.5- Análise estatística.....	17
2.3- RESULTADOS	17
2.4- DISCUSSÃO	31
3- CAPÍTULO II- Resposta Comportamental de <i>Biomphalaria glabrata</i> frente a concentração subletal (CL₅₀) do látex de <i>Euphorbia milii</i> var. <i>hislopü</i>	33
RESUMO	34
ABSTRACT	35
3.1- INTRODUÇÃO	36
3.2- MATERIAL E MÉTODOS	37
3.2.1- Nota ética.....	37
3.2.2- Coleta e liofilização do látex de <i>Euphorbia milii</i>	37
3.2.3- Manutenção e exposição de <i>Biomphalaria glabrata</i> ao látex de <i>Euphorbia milii</i>	37
3.2.3- Atividade locomotora de <i>Biomphalaria glabrata</i>	38
3.2.4- Parâmetros reprodutivos de <i>Biomphalaria glabrata</i>	38

3.2.5- Análise estatística.....	38
3.3- RESULTADOS	39
3.4- DISCUSSÃO	50
4- CONCLUSÕES GERAIS	52
5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
6- ANEXOS	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplar de <i>Biomphalaria glabrata</i> mantido individualmente. Fonte: (LAPSA/IOC/Fiocruz- Acervo pessoal).....	01
Figura 2. Tipos de deslocamento de <i>Biomphalaria glabrata</i> . Fonte: Barbosa (1995).....	03
Figura 3. Sistema reprodutor masculino e feminino e órgãos hermafroditas de <i>B. glabrata</i> . Fonte: Souza & Lima (1990).....	05
Figura 4. Massas ovíferas de <i>Biomphalaria glabrata</i> . Fonte: LEE/IOC/Fiocruz.....	05
Figura 5. Ciclo de <i>Schistosoma mansoni</i> . Fonte: Schall et al. (2007).....	07
Figura 6. Percentual de casos de esquistossomose no Brasil em populações residentes. Fonte: IBGE (2010).....	09
Figura 7. <i>Euphorbia milii</i> (syn. <i>splendens</i>) var. <i>hislopii</i> . Fonte: MS (2007).....	10

CAPÍTULO I

Figura 1. Semanas de análises dos parâmetros reprodutivos de <i>Biomphalaria glabrata</i> infectada com <i>Schistosoma mansoni</i> . Massas ovíferas (média).....	20
Figura 2. Semanas de análises dos parâmetros reprodutivos de <i>Biomphalaria glabrata</i> infectada com <i>Schistosoma mansoni</i> . Ovos (média).....	21
Figura 3. Semanas de análises dos parâmetros reprodutivos de <i>Biomphalaria glabrata</i> infectada com <i>Schistosoma mansoni</i> . Moluscos eclodidos (média).....	22
Figura 4. Comparação entre os gráficos de biomonitoramento de <i>Biomphalaria glabrata</i> (Positivo, Exposto e Não exposto) infectado com <i>Schistosoma mansoni</i> , em 60 intervalos de 1 min de monitoramento da Distância percorrida (mm).....	23
Figura 5. Comparação entre os gráficos de biomonitoramento de <i>Biomphalaria glabrata</i> (Positivo, Exposto e Não exposto) infectado com <i>Schistosoma mansoni</i> , em 60 intervalos de 1 min de monitoramento do Tempo ambulatorial (s).....	24
Figura 6. Comparação entre os gráficos de biomonitoramento de <i>Biomphalaria glabrata</i> (Positivo, Exposto e Não exposto) infectado com <i>Schistosoma mansoni</i> ,	

em 60 intervalos de 1 min de monitoramento da Velocidade média (mm/s).....	25
Figura 7. Comparação entre os gráficos de biomonitoramento de <i>Biomphalaria glabrata</i> (Positivo, Exposto e Não exposto) infectado com <i>Schistosoma mansoni</i> , em 60 intervalos de 1 min de monitoramento do Tempo estereotipado (s).....	26
Figura 8. Comparação entre os gráficos de biomonitoramento de <i>Biomphalaria glabrata</i> (Positivo, Exposto e Não exposto) infectado com <i>Schistosoma mansoni</i> , em 60 intervalos de 1 min de monitoramento do Tempo em repouso (s).....	27
Figura 9. Correlação entre o Tempo estereotipado do grupo positivo de <i>Biomphalaria glabrata</i> e o número de cercárias eliminadas.....	28
Figura 10. Correlação entre o número de ovos do grupo positivo de <i>Biomphalaria glabrata</i> e o número de cercárias eliminadas.....	29

CAPÍTULO II

Figura 1. Comparação entre os gráficos de biomonitoramento de <i>Biomphalaria glabrata</i> (Controle, 1 d.p.e. e 30 d.p.e.) exposto ao látex de <i>Euphorbia milii</i> (syn. <i>splendens</i>) var. <i>hislopii</i> , em 60 intervalos de 1 min de monitoramento da Distância percorrida (mm).....	39
Figura 2. Comparação entre os gráficos de biomonitoramento de <i>Biomphalaria glabrata</i> (Controle, 1 d.p.e. e 30 d.p.e.) exposto ao látex de <i>Euphorbia milii</i> (syn. <i>splendens</i>) var. <i>hislopii</i> , em 60 intervalos de 1 min de monitoramento do Tempo ambulatorial (s).....	40
Figura 3. Comparação entre os gráficos de biomonitoramento de <i>Biomphalaria glabrata</i> (Controle, 1 d.p.e. e 30 d.p.e.) exposto ao látex de <i>Euphorbia milii</i> (syn. <i>splendens</i>) var. <i>hislopii</i> , em 60 intervalos de 1 min de monitoramento da Velocidade média (mm/s).....	41
Figura 4. Comparação entre os gráficos de biomonitoramento de <i>Biomphalaria glabrata</i> (Controle, 1 d.p.e. e 30 d.p.e.) exposto ao látex de <i>Euphorbia milii</i> (syn. <i>splendens</i>) var. <i>hislopii</i> , em 60 intervalos de 1 min de monitoramento do Tempo estereotipado (s).....	42
Figura 5. Comparação entre os gráficos de biomonitoramento de <i>Biomphalaria glabrata</i> (Controle, 1 d.p.e. e 30 d.p.e.) exposto ao látex de <i>Euphorbia milii</i> (syn. <i>splendens</i>) var. <i>hislopii</i> , em 60 intervalos de 1 min de monitoramento do Tempo em repouso (s).....	43
Figura 6. Semanas de análises dos parâmetros reprodutivos de <i>Biomphalaria glabrata</i> exposta ao látex de <i>Euphorbia milii</i> (syn. <i>splendens</i>) var. <i>hislopii</i> .	

Número de massas ovíferas.....	44
Figura 7. Semanas de análises dos parâmetros reprodutivos de <i>Biomphalaria glabrata</i> exposta ao látex de <i>Euphorbia milii</i> (syn. <i>splendens</i>) var. <i>hislopii</i> . Número de ovos.....	45
Figura 8. Semanas de análises dos parâmetros reprodutivos de <i>Biomphalaria glabrata</i> exposta ao látex de <i>Euphorbia milii</i> (syn. <i>splendens</i>) var. <i>hislopii</i> . Número de moluscos eclodidos.....	46

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Avaliação dos parâmetros reprodutivos dos caramujos positivos e expostos em relação ao número de massas de ovos, ovos e caramujos eclodidos ao longo de nove semanas.....	18
---	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Número de massas ovíferas/caramujo, ovos/caramujo, ovos/desovas e Taxa de eclodibilidade por semana dos grupos controle e pós-exposição (1 d.p.e. e 30 d.p.e.).....	47
---	----

RESUMO

ALBERTO-SILVA, Anna Carla. **Alterações locomotoras e reprodutivas em *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (MOLLUSCA: PLANORBIDAE) hospedeiro intermediário de *Schistosoma mansoni* SAMBON, 1907 (TREMATODA: SCHISTOSOMATIDAE) sob condições de estresse.** 2016. 63p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2016.

Os efeitos da infecção por parasitos e da ação de contaminantes em moluscos tem influência direta sobre o comportamento destas espécies, dentre eles o locomotor e o reprodutivo, funcionando como biomarcadores de estresse e da qualidade da água. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade locomotora e reprodutiva de *Biomphalaria glabrata*, principal hospedeiro intermediário de *Schistosoma mansoni* no Brasil, sob duas condições de estresse diferentes: a infecção parasitária por *S. mansoni* e a ação de um moluscicida, o látex de *Euphorbia milii* var. *hislopii*. Estes fatores de estresse foram avaliados separadamente em *B. glabrata* em relação aos parâmetros locomotores usando o sistema de biomonitoramento por análise de imagem Videomex V® e reprodutivos, analisando fecundidade e eclodibilidade. Para avaliar a atividade locomotora foram analisados cinco parâmetros: ‘Distância percorrida’, ‘Tempo ambulatorial’, ‘Tempo estereotipado’, ‘Tempo em repouso’ e ‘Velocidade média’. A infecção foi observada em dois momentos diferentes: antes e após a infecção e a exposição ao látex na concentração subletal (CL₅₀ - 0,53 mg/L) em três momentos diferentes: antes da exposição (grupo controle), 1 dia pós exposição (grupo 1 d.p.e.) e 30 dias pós exposição (grupo 30 d.p.e.). Os parâmetros reprodutivos de *B. glabrata* analisados foram: número de massas ovíferas, ovos e moluscos eclodidos. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa R. Dos moluscos infectados com *S. mansoni*, 47,8% eliminaram cercárias (positivos) e 52,2% (expostos) não eliminaram cercárias. A atividade locomotora de todos os moluscos aumentou significativamente após a infecção por *S. mansoni*. Contudo, os moluscos positivos foram menos móveis comparados aos expostos. Com relação à reprodução, 84,8% dos moluscos positivos não conseguiram restabelecer o número de massas ovíferas durante o período patente. O número de cercárias eliminadas individualmente por cada molusco positivo apresentou uma relação positiva com o tempo estereotipado e uma relação negativa com o número de ovos. Quanto aos efeitos da exposição ao látex de *E. milii* var. *hislopii* em *B. glabrata* foi observado um decréscimo significativo (p-value<0.05) de todas as atividades locomotoras dos moluscos do grupo 1 d.p.e em comparação ao controle. Não houve diferença significativa entre os grupos controle e o 30 d.p.e. Comparando os grupos pós exposição (1 dia e 30 dias) foi observado uma redução na atividade locomotora do grupo 1 d.p.e. Em relação aos parâmetros reprodutivos, a relação ovos/massa ovífera diminuiu na semana seguinte a exposição (6ª semana) enquanto houve aumento na taxa de eclosão. Após trinta dias, estes parâmetros reprodutivos foram similares aos observados nestes mesmos moluscos antes da exposição. Houve, no entanto, redução no número de moluscos eclodidos após a exposição até o final do experimento (10ª semana). Concluímos que a infecção por *S. mansoni* e a exposição ao látex de *E. milii* var. *hislopii* afetam o comportamento locomotor e reprodutivo de *B. glabrata* de forma diferente, sendo capaz de influenciar na epidemiologia da transmissão da esquistossomose.

Palavras-chave: Esquistossomose, Látex de *Euphorbia milii*, Comportamento locomotor e reprodutivo

ABSTRACT

ALBERTO-SILVA, Anna Carla. **Changes in the locomotor and reproductive of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (MOLLUSCA: PLANORBIDAE) intermediate host of *Schistosoma mansoni* SAMBON, 1907 (TREMATODA: SCHISTOSOMATIDAE) under stress conditions.** 2016. 63p. Dissertation (Master Science). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2016

The effects of infection by parasites and action of the pollutants in freshwater mollusks have a direct influence on their behaviour, as the locomotor and reproductive, that can be used as stress and quality of water biomarkers. The aim of this study was to evaluate the locomotor and reproductive activities of *Biomphalaria glabrata*, the main intermediate host of *Schistosoma mansoni* in Brazil on two different conditions of stress: a parasitic infection by *S. mansoni* and under the action of a molluscicide, the latex of *Euphorbia milii* var. *hislopii*. These stress factors were evaluated separately in *B. glabrata* on locomotor parameters using image analysis biomonitoring system Videomex V® and reproductive, analyzing fertility and hatchability. To assess the locomotor activity five parameters were analyzing: 'Distance travelled', 'Ambulatory time', 'Stereotypic time', 'Resting time' and 'Average speed'. The infection was observed at two different times: before and after the infection; the exposition to sublethal latex concentration (LC₅₀ - 0.53 mg/L) was observed at three different times: before exposure (control group) 1 day after exposure (group 1 d.p.e.) and 30 days after exposure (group 30 d.p.e.). The reproductive parameters analyzed of the *B. glabrata* were the number of egg masses, eggs and number of snails hatched. All statistical analyzes were performed using the program R. From snails infected with *S. mansoni*, 47.8% shed cercariae (positive snails) and 52.2% (exposed snails) did not shed it. The locomotor activity of all mollusks increased significantly after infection with *S. mansoni*. However, the positive snails were slower than exposed snails. In relation of the reproduction, 84.8% of positive snails reduced the number of eggs masses during the patent period. The number of cercariae shed by individual snails showed a positive relation with the Stereotypical time and a negative relation with the number of eggs. The effects of exposure to *E. milii* var. *hislopii* latex in *B. glabrata* decreased significantly (p-value <0.05) all locomotory activity of the snails group 1 d.p.e. compared to the control group. There was no significant difference between the control group and 30 d.p.e. group. Comparing the post-exposure groups (1 day and 30 days) a reduction in locomotor activity in group 1 d.p.e. was observed. Regarding the reproductive parameters, the eggs/eggs masses ratio decreased in the following week after exposition (6th week) while the hatching rate increased. After thirty days of exposition, these reproductive parameters, in the same snails, were similar to those measured before the exposition. However, the number of hatched snails after exposure reduced until the end of the experiment (10th week). We conclude that infection by *S. mansoni* and the exposure to *E. milii* var. *hislopii* latex affected differently the locomotor and reproductive behaviours of *B. glabrata* being able to influence the epidemiology of transmission of schistosomiasis.

Keywords: Schistosomiasis, *Euphorbia milii* latex, locomotor and reproductive behaviours

1- INTRODUÇÃO GERAL

A água tem sido considerada um dos recursos naturais mais preciosos dos últimos tempos e a preservação de seus reservatórios naturais tem se tornado preocupação mundial. Deste modo, a avaliação biológica da qualidade da água é um fator importante para o manejo e proteção dos ecossistemas aquáticos, pois garantir a qualidade da água é possibilitar a manutenção das espécies (QUEIROZ et al., 2008).

Dentre os organismos aquáticos que atuam como bioindicadores estão os moluscos devido à sua adaptação a ambientes ricos em matéria orgânica e à sua sensibilidade a baixas concentrações de poluentes. Ressalto que os moluscos são importantes elos no ciclo biológico de diferentes parasitos de importância médica e veterinária, como os causadores da Esquistossomose (CARVALHO et al., 2008).

Estudos que forneçam conhecimento sobre os efeitos de estressores, como a infecção parasitária e ação de um moluscicida no comportamento locomotor e reprodutivo de moluscos são importantes para estudos epidemiológicos e de controle da transmissão da esquistossomose, além de servir como indicador de estresse e de qualidade da água.

1.1- *Biomphalaria glabrata*(Say, 1818) (Gastropoda: Planorbidae)

O gênero *Biomphalaria* possui 30 espécies distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais na América do Sul, África Subsaariana e Ásia (MORGAN et al., 2001; DEJONG et al., 2001, 2003; SIMOONGA et al., 2009; TOLEDO & FRIED, 2011; HOTEZ et al., 2012). Dentre as espécies, *Biomphalaria tenagophila*(Orbigny, 1835), *B. straminea*(Dunker, 1848) e *B. glabrata* são hospedeiros intermediários de *Schistosoma mansoni* Brasil, sendo esta última, a de maior importância epidemiológica.

Os exemplares de *B. glabrata* possuem concha lisa em espiral plana, sinistrógira, discóides e com duas depressões na sua parte central, chamada de umbigo (*bi* (dois) e *omphalos* (umbigo) (Figura 1). Medem em torno de 20 a 30 mm de diâmetro e contem de seis a sete giros arredondados, sem a presença de carenas (PARAENSE, 2008). Apresentam crista renal no tubo renal como característica taxonômica diferenciadora. Possuem sistema respiratório, digestório, circulatório, locomotor, reprodutor, excretor e nervoso adaptados ao ambiente onde vivem (CARVALHO et al., 2008).



Figura 1- Exemplar albino de *Biomphalaria glabrata* mantido individualmente (LAPSA/IOC/Fiocruz - Acervo pessoal).

As espécies de *Biomphalaria* são herbívoras, se alimentando de folhas preferencialmente mais tenras e algas. Entretanto, podem viver como saprófitas de acordo com as variações do ambiente. Em laboratório geralmente são alimentadas por alface fresca ou desidratada e triturada. Utilizam uma estrutura denominada rádula que fica localizada dentro da boca para raspar o alimento (JANNOTTI-PASSOS et al., 2008). Podem viver enterradas no substrato em condições ambientais desfavoráveis e suportar períodos de jejum de 30 dias, no entanto após 24 horas de jejum, observam-se alterações metabólicas no molusco (BECKER, 1980,1983; PINHEIRO, 2007).

Estes moluscos podem ser encontrados em uma grande diversidade de ambientes de água doce, em águas paradas ou com pouca correnteza como lagos, córregos, açudes, rios, riachos, pântanos, remansos, valas de irrigação e de drenagem, plantações, principalmente de arroz e agrião, poças, cisternas ou em áreas alagadas de forma natural ou artificial. Não foram encontradas ainda em águas com grande correnteza e com presença de ondas. Tem preferência por águas rasas, tendo como substrato o leito e as plantas com suas raízes nas margens, onde encontram condições ecológicas para sua sobrevivência e reprodução (SOUZA et al., 2008).

Quanto às características físico-químicas do ambiente aquático, toleram variações de condutividade, presença de alguns metais como cálcio, sódio, potássio e cloretos, amplas faixas de dióxido de carbono, amônia, oxigênio dissolvido, além de temperatura na faixa de 18° C a 41°C, pH entre 6 e 8, turbidez com o mínimo de 3,7 e máximo de 230 (FTU), cloreto de sódio abaixo de 3g/L e 2,6g/L de Cloro (BRASIL, 2008).

Uma característica ecológica importante que determina a formação de novos criadouros ou dispersão de moluscos nos ambientes é a pluviosidade. Nas áreas mais secas, onde as chuvas só ocorrem em determinadas épocas do ano, estas podem servir para dispersar populações de moluscospela correnteza, mas também para formação de novos criadouros. Nos períodos com ausência de chuvas, os criadouros vão secando e os moluscos podem realizar o fenômeno denominado de anidrobiose ou estivação, vivendo durante meses em criadouros secos, enterrados no substrato na região hiporréica do recurso hídrico. O metabolismo dos moluscos diminui, ocorre redução do peso, o molusco se contrai e secreta uma camada de muco para impedir a perda de água, depositado na abertura da concha (BEZERRA et al., 1999).

Por apresentar padrões comportamentais simples e de fácil avaliação, dentre eles seus processos locomotores e reprodutivos, *B. glabrata* tem sido utilizada em estudos de alterações ocasionadas por concentrações subletais de vários produtos (SANTOS et al., 2005; MELLO-SILVA et al., 2011).

1.1.1- Padrão locomotor de *Biomphalaria glabrata*

Em relação à locomoção de *B. glabrata* os principais trabalhos foram realizados na década de 1980 e utilizaram como recursos de observação: registros fotográficos, fotocinematografia com lapso de tempo e videotape (PIERI et al., 1980; JURBERG et al., 1995).

O pé de *B. glabrata* é adaptado não somente para locomoção, mas também para fixação ao substrato. Locomovem-se por pé ventral, em formato de sola, com grande quantidade de músculos, que realizam ondas de contração ao longo do comprimento do corpo do animal, permitindo a locomoção por rastejamento. Há produção de muco pela glândula que é localizada na parte anterior do pé, para auxiliar no processo de adesão.

São capazes de se locomover em posição invertida, em forma de deslizamento (BARBOSA, 1995).

Pieri (1980) e Jurberg et al. (1995) caracterizaram a existência de seis tipos de deslocamentos em *B. glabrata*, sendo eles: 1- deslizar, 2- arrastar, 3- descida súbita, 4- subida súbita, 5- boiar e 6- saída da água. Os dois primeiros ocorrem quando o molusco tem o pé em contato com o substrato, podendo esse ser até mesmo a película da água, realizando assim o deslizamento, o 3º e o 4º movimento ocorre quando o pé não está em contato com substrato, o 5º é o realizado entre os momentos de deslocamento, sendo considerado passivo, dependente das correntes. No 6º movimento, o caramujo rompe a película da água, ficando com a massa cefalopediosa distendida fora da concha e fora da água (Figura 2). Jurberg et al. (1995) enfatizaram que as subidas súbitas ou ida a superfície estão associadas à respiração e as descidas súbitas ou retorno ao fundo estavam associadas à busca por alimento. No decorrer de uma hora, os moluscos vão à superfície menos de duas vezes, entretanto permanecem cerca de 2 minutos.

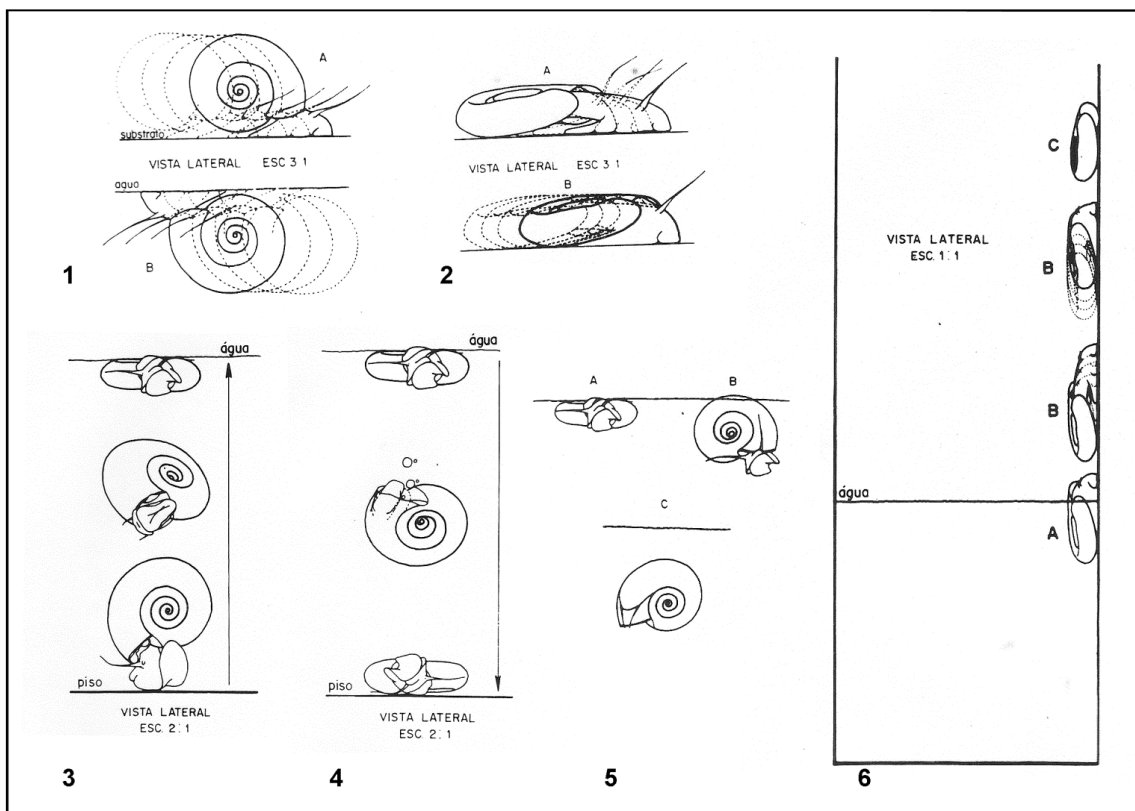


Figura 2 – Tipos de deslocamento de *Biomphalaria glabrata*. 1- deslizar, 2- arrastar, 3- subida súbita, 4- descida súbita, 5- boiar e 6- saída da água (BARBOSA, 1995)

1.1.2-Padrão reprodutivo de *Biomphalaria glabrata*

Biomphalaria glabrata são animais hermafroditas, realizam autofecundação e fecundação cruzada, sendo esta última, a mais usual nesses animais. Neste tipo de reprodução, um molusco atua como macho e o outro como fêmea. Na fecundação cruzada se verifica maior nível de fertilidade e fecundidade, aumentando a variabilidade genética das espécies (PARAENSE, 1976, 2008; COSTA et al., 2004). Em situações onde a população está reduzida, esses animais se reproduzem por autofecundação, possibilitando que criadouros desfeitos por enxurradas possam ser restabelecidos em poucos meses a partir de um molusco. Quando a população se restabelece no criadouro, os moluscos retornam à preferência pela fecundação cruzada (PARAENSE, 1975, 2008).

Possuem uma única gônada em formato de cacho, com muitos ácidos, chamada de ovoteste onde os óvulos e os espermatozoides são formados um ao lado do outro (Figura 3). O ovispermiduto, canal hermafrodita, se divide na encruzilhada genital, formando as vias femininas e masculinas, que possuem uma grande complexidade estrutural. Na encruzilhada encontra-se a glândula de albúmen que se liga ao oviduto no início da parte feminina. Esta glândula é o órgão responsável pela produção da substância gelatinosa e rica em carboidratos da massa ovígera. O oviduto se transforma ao longo do seu trajeto em um canal mais dilatado, denominado de glândula nidamental, seguida pela vagina, onde sai o duto da espermateca que não guarda os espermatozoides mas possui a função de reabsorver os materiais excretados pelo sistema genital. As vias masculinas são compostas por espermiduto, glândula prostática, canal deferente e o complexo peniano, esse último formado pela bolsa do pênis e o prepúcio. O número de divertículos do ovoteste e da próstata, presença ou ausência de enrugamento vaginal e a proporção entre a bainha pênis e a porção mais dilatada do canal deferente são características morfológicas diferenciadoras entre as espécies de *Biomphalaria* (SOUZA & LIMA, 1990; PARAENSE et al., 2008).

Os espermatozoides são produzidos no ovoteste, mas só se transformam em espermatozoides depois que passam pela vesícula seminal. Os espermatozoides fecundam os óvulos nos divertículos irregulares do conduto ovispermático, na região hermafrodita do sistema reprodutor, quando se reproduzem por autofecundação. Em fecundação cruzada, os alo-espermatozoides (espermatozoides provenientes do molusco que está exercendo o papel de macho) ficam localizados no canal coletor do ovoteste, na saída da glândula hermafrodita do indivíduo que exerce o papel de fêmea. Quando os óvulos maduros passam por este canal são fecundados por estes espermatozoides. Uma vez fecundados, não permitem a entrada de outro espermatozoide, privilegiando assim a fecundação cruzada (PARAENSE, 1976; BRASIL, 2008).

Os moluscos atingem a maturidade sexual com 30 dias de idade, começando então a postura de ovos. Os ovos são contidos em uma membrana gelatinosa e transparente, denominada de massa ovígera, essas podem conter de 1 a 100 ovos (Figura 4). Esses são postos diariamente geralmente em superfícies flutuantes, como folhas de plantas, pedaços de isopor (em laboratórios) e até mesmo vasilhas de plástico entre outros objetos devido à grande quantidade de lixo presente nos recursos hídricos.

Os miracídios eclodem após sete dias, nascendo assim um molusco pequeno idêntico ao molusco indivíduo adulto. Podem viver cerca de um ano, entretanto em condições laboratoriais há registro de até dois anos (PARAENSE, 2008).

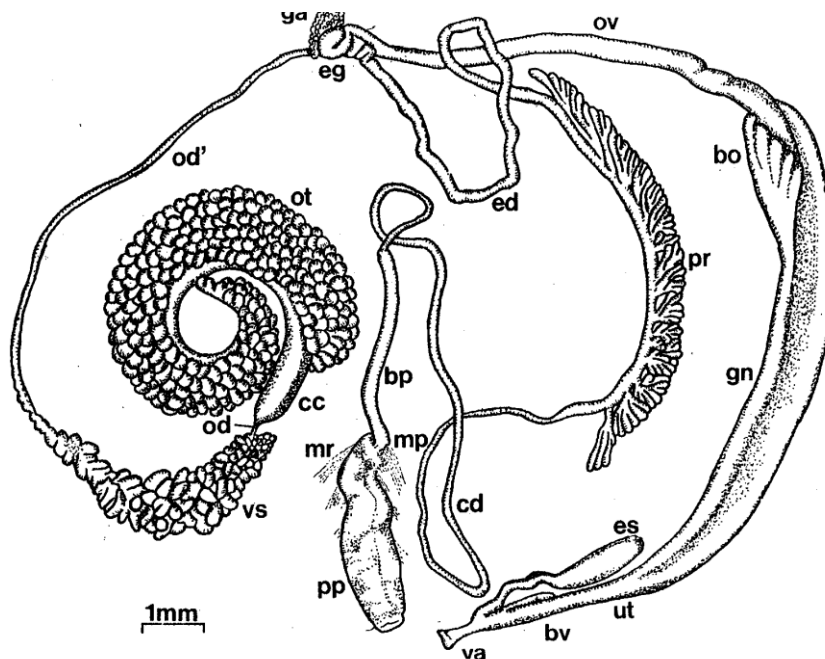


Figura 3- Sistema reprodutor masculino e feminino e órgãos hermafroditas de *Biomphalaria glabrata* (SOUZA & LIMA, 1990). Abreviações: (cc)- canal coletor do ovoteste; (eg)- encruzilhada genital; (od)- ovispermídito proximal; (od)- ovispermídito distal; (ot)- ovoteste; (vs)- vesícula seminal; (bp)- bainha do pênis; (cd)- canal deferente; (ed)- espermídito; (mr)- músculo retrator; (mp)- músculo protator; (pp)- prepúcio; (pr)- próstata; (bo)- bolsa do oviduto; (bv)- bolsa vaginal; (ga)- glândula de albúmen; (gn)- glândula nidamental; (es)- espermateca; (ov)- oviduto; (va)- vagina; (ut)- útero.

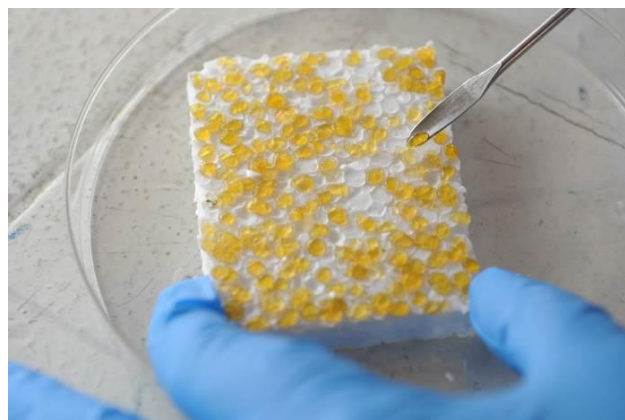


Figura 4- Massas ovíferas de *Biomphalaria glabrata* (LEE/IOC/Fiocruz)

1.2- *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907

De acordo com a posição taxonômica, *Schistosoma mansoni* pertence ao filo Platyhelminthes, a classe Trematoda, subclasse Digenea e família Schistosomatidae. Possuem os seguintes estádios evolutivos: vermes adultos machos e fêmeas, ovo, miracídio, esporocistos primários e secundários, cercária e esquistossômulo.

Os vermes adultos possuem acentuado dimorfismo sexual. O macho adulto mede cerca de 1 cm, possui duas ventosas (oral e ventral) e um canal ginecóforo, que é uma fenda, onde a fêmea se aloja para ser fecundada. O tegumento do macho é coberto por tubérculos, mais abundante na região dorsal e minúsculos espinhos na superfície dorsal e ventral. O canal ginecóforo apresenta-se coberto por microespinhos, o que facilita a permanência da fêmea durante a cópula. O sistema digestório é incompleto onde após a abertura oral segue o esôfago que se bifurca em dois cecos intestinais que se unem novamente e terminam em prolongamento único (LAMBERTUCCI, 2010).

O aparelho genital masculino contém um testículo com 6 a 8 lóbulos, localizados no dorso da região posterior. Não possui órgão copulador, então, os espermatozoides passam dos canais deferentes para poro genital masculino e são transferidos para a fêmea pelo poro genital feminino, fecundando-a (MACHADO-SILVA et al., 2008).

As fêmeas são delgadas e cilíndricas, medem cerca de 1,5 cm e na região anterior se encontram as ventosas oral e a ventral, que são pequenas. O poro genital tem abertura para região ventral. O aparelho reprodutor é composto por um único ovário oblongo situado na metade anterior do corpo, seguido por oviduto, receptáculo seminal (região mais larga do oviduto, onde são armazenados os espermatozoides), oótipo circundado pelas glândulas de Mehlis, útero e poro genital feminino. A parte posterior do corpo, ocupando em torno de 2/3 do corpo da fêmea é composta pelas glândulas vitelogênicas, que são responsáveis pela formação da casca do ovo. O viteloduto que contém as substâncias produzidas por estas glândulas desemboca no oviduto, próximo ao oótipo (MACHADO-SILVA et al., 2008).

Os ovos medem em média 150 µm de comprimento e 65 µm de largura. Possuem o pólo anterior mais fino e o posterior mais volumoso e com um espinho lateral com 20µm bem evidente, além de microespinhos presentes na superfície do ovo. A casca externa é chamada de *corium* e possui a coloração amarelada e transparente. Após os ovos estarem no ambiente aquático, ocorre a eclosão dos miracídios. (LENZI et al., 2008a).

Dos ovos eclodem os miracídios que têm forma cilíndrica com extremidade cônica, onde se localiza o *terebratorium*. Medem em torno de 160 a 180 µm de comprimento por 60 µm de largura, possuem o tegumento com placas epidérmicas ciliadas, apresentam glândulas de adesão e penetração, reserva de glicogênio e células germinativas que darão origem as cercárias no interior do molusco hospedeiro. O molusco libera substâncias que estimulam e aceleram os movimentos dos miracídios (DESPOMMIER et al., 2005).

Dentro do molusco, o miracídio perde sua superfície ciliada, as estruturas de penetração e a musculatura definham. Após oito dias se transformam em um tubo enovelado, sem movimento e com muitas células germinativas, sendo então chamado de esporocisto primário (REY, 2008; CARVALHO et al., 2008). Os esporocistos migram para glândula digestiva do molusco e aumentam de tamanho chegando a 250 µm de comprimento, por conta da diferenciação das células em cercárias, são chamados de esporocistos secundários (REY, 2008; CARVALHO et al., 2008).

As cercárias medem cerca de 5mm de comprimento e é dividida em duas partes: corpo e cauda. O corpo possui 200 μm por 700μm e é recoberto por numerosos microespinhos, possuem duas ventosas, uma oral localizada na parte anterior e outra ventral na região posterior. A cauda mede cerca de 320μm e possui uma bifurcação no extremo distal. As furcas na cercária de *S. mansoni* são menores que o corpo da mesma. A parede do corpo da larva é composta por músculos longitudinais e circulares que fornecem mobilidade (CARVALHO et al., 2008).

A transformação de cercárias para esquistossômulos ocorre logo após a penetração das cercárias no hospedeiro mamífero. Os esquistossômulos sofrem intensas modificações ultraestruturais e fisiológicas desde primeiras horas após a infecção, com a perda do glicocálix, conversão do tegumento trilaminar em heptalaminar e mudança do metabolismo energético de aeróbio para anaeróbio (MACHADO-SILVA et al., 2008).

O ciclo de vida de *S. mansoni* necessita de dois hospedeiros: hospedeiro intermediário (molusco dulcícola) e hospedeiro definitivo (vertebrado) (COLLINS III et al., 2011) (Figura 5). O homem é o principal hospedeiro definitivo, mas outros mamíferos como os roedores aquáticos podem servir como reservatório por conta da sua capacidade de manter o ciclo do parasito (MALDONADO Jr et al., 2006). Modena et al. (2008) relataram a importância da dispersão dos ovos de *S. mansoni* pelo gado bovino, devido a comercialização do mesmo sem o controle adequado.

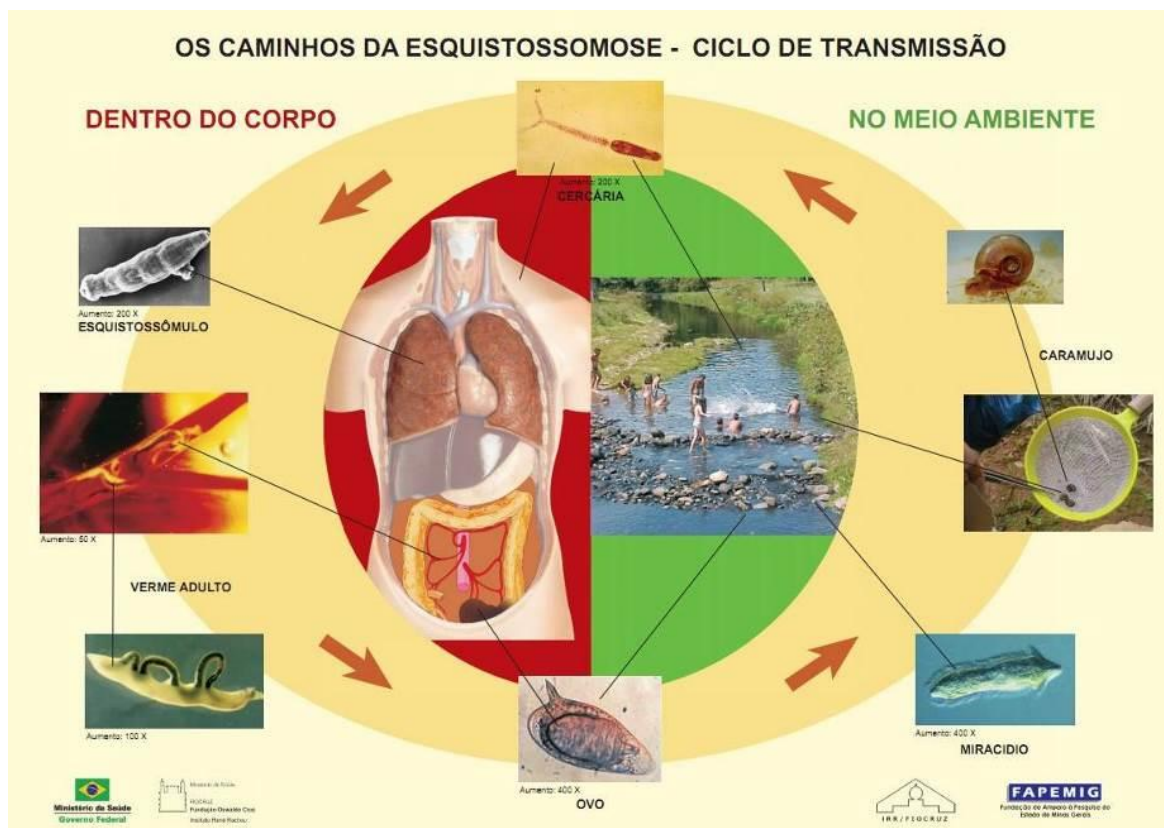


Figura 5- Ciclo de *Schistosoma mansoni* (SCHALL et al., 2007).

A fêmea de *S.mansoni* pode colocar 300 ovos por dia. Os ovos postos nas vênulas do plexo hemorroidário podem seguir dois caminhos, parte deles rompe as vênulas, caem na luz intestinal, se misturam com o bolo fecal e saem pelas fezes. Outra parte dos ovos volta a favor da corrente sanguínea e se tornam os elementos principais da patogenia da esquistossomose, causadores de granulomas, reação patognomônica da esquistossomose (LENZI et al., 2008b). Uma pessoa contaminada elimina pelas fezes ovos do parasito após a 5ª semana de infecção e pode continuar durante o período de 6 a 10 anos, existindo casos de até 20 anos (MACHADO-SILVA et al., 2008).

Os ovos de *S.mansoni* são eliminados pelo hospedeiro definitivo junto com as fezes. Fora do organismo os ovos se mantêm até cinco dias na massa fecal sólida, em massa fecal líquida somente por um dia, por conta da fermentação. Segundo Rey (2008), o fator mais relevante no processo de eclosão é a hipotonicidade do meio, aumentando assim a pressão interna e conseqüentemente a ruptura da casca.

Após a eclosão, o miracídio nada em direção à superfície até encontrar o molusco e penetrar pelo seu tegumento, esse processo deve ocorrer nas primeiras horas de vida livre já que após 6 horas ele se torna inativo. O miracídio se fixa em diferentes tecidos do molusco. Em temperaturas em torno de 26°C metade dos miracídios morrem nas oito primeiras horas (LAMBERTUCCI, 2010). No interior do molusco, os miracídios se diferenciam em esporocistos primários e posteriormente em esporocistos secundários nos tecidos do molusco. Na glândula digestiva, os esporocistos banhados pela hemolinfa, adquirem reserva energética (glicose) e arginina para a diferenciação das células em cercárias (PINHERO, 2007). Esta transformação ocorre em torno de 28 a 35 dias. Podem ocorrer várias gerações de esporocistos secundários, que mantêm a eliminação de cercárias pelo hospedeiro intermediário. As cercárias são eliminadas na água, movimentando-se com reserva energética de até 12 horas para infectar o hospedeiro definitivo vertebrado (SOUZA & LIMA, 1990).

Nos primeiros dias a quantidade de cercárias emergentes é pequena, mas pode chegar de 3.000 a 4.500 cercárias sendo liberadas por dia durante a 5ª semana de infecção. Esse número pode se manter pelos próximos dois meses em *B.glabrata*, sendo uma característica importante desta espécie para a manutenção do ciclo de *S.mansoni*. Posteriormente pode vir a morrer devido à alta eliminação de cercárias (WALKER, 2011).

As cercárias entram em contato com o hospedeiro vertebrado pela sua pele ou superfície mucosa orofaríngea que esteja exposta. Esse processo pode ter a durabilidade de 15 minutos. Quando atinge a corrente sanguínea, as cercárias não possuem mais a cauda e seu corpo se alonga, apresentando aspecto vermiforme, sendo chamada de esquistossômulos (REY, 2008). Após a sua permanência na pele, os esquistossômulos penetram nos vasos sanguíneos, e pela circulação chegam ao lado direito do coração e aos pulmões. Em seguida vão para o lado esquerdo do coração e migram para todas as partes do corpo, através da circulação geral. Os parasitos se alimentam de sangue e quando chegam ao sistema porta intra-hepático no período de até três semanas, eles crescem e completam seu desenvolvimento, se tornando vermes adultos (COLLEY et al., 2014).

Por volta da 3ª semana de infecção, a fêmea de *S. mansoni* entra no canal ginecóforo do macho para o acasalamento e ambos se deslocam contra a corrente circulatória do sistema porta para as vênulas da parede do reto, do sigmóide e do intestino grosso do hospedeiro definitivo, deslocando-se pela rede vascular, onde colocam os ovos. Parte destes saem pelas fezes, reiniciando o ciclo (CARVALHO et al., 2008).

1.3- Esquistossomose mansônica

A esquistossomose mansônica é a principal helmintíase no mundo quanto à morbidez e mortalidade, presente nas Américas, Ásia e África (HOTEZ et al., 2008, 2012). Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) acredita-se que a esquistossomose acometa 200 milhões de pessoas em 74 países. No Brasil estima-se que cerca de seis milhões de pessoas estão infectadas, principalmente na região nordeste e em Minas Gerais (BRASIL, 2014). Recentemente, Scholte et al. (2014) relataram uma expansão territorial e numérica de casos de esquistossomose no Brasil associados a fatores ambientais, como o aumento da poluição por dejetos orgânicos e a ocupação desordenada de territórios. Além disso, as mudanças climáticas e outras intervenções antrópicas como construção de hidrelétricas são fatores que ampliam a possibilidade de transmissão da doença no Brasil (THIENGO et al., 2005; PATZ & CHRISTENSON, 2011; PETERSON et al., 2011).

Para o controle da esquistossomose, a Organização Mundial de Saúde (OMS) tem estimulado a administração em massa do quimioterápico Praziquantel® nas populações com alto risco de infecção e o uso de moluscicida Niclosamida (2'-5'-dicloro-4'-nitrosalicylanilida) em recursos hídricos epidemiologicamente ativos, em áreas de alta endemicidade (WHO, 2014).

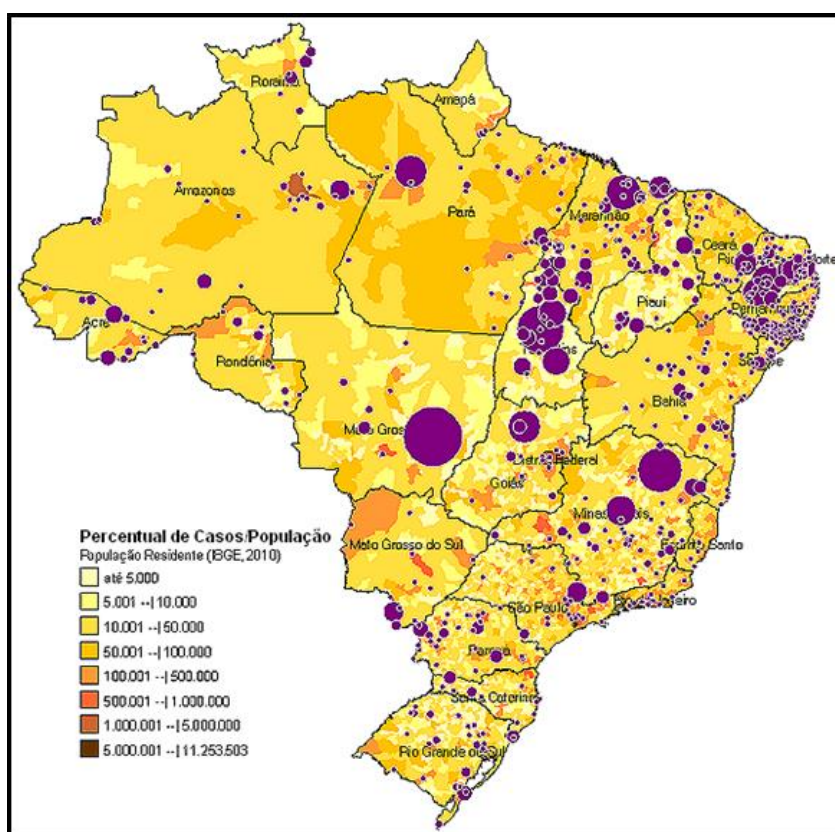


Figura 6 - Percentual de casos de esquistossomose no Brasil em populações residentes (IBGE, 2010).

Em virtude desta recomendação, o Ministério da Saúde (MS) lançou um plano integrado de ações estratégicas para eliminação esquistossomose como um problema de saúde pública, preconizando tratamento com Praziquantel® da população residente em áreas de maior risco e saneamento básico. Segundo o portal do MS (BRASIL, 2016), o plano promoveu em áreas endêmicas uma redução de 65,86% do número de casos, todavia houve um aumento de 159% de 2014 para 2015 de casos da doença em áreas não endêmicas.

Devido à resistência das pessoas ao quimioterápico de escolha e ao alto custo do moluscicida sintético preconizado pela OMS, pesquisas com moluscicidas de origem vegetal têm sido realizadas, pois apresentam baixo custo, são biodegradáveis e podem ser utilizados em doses subletais.

1.4- Moluscicida natural: o látex de *Euphorbia milii*

A *Euphorbia milii* var. *hislopii* pertence à família Euphorbiaceae, esta possui mais de 2000 mil espécies descritas. É popularmente conhecida como Coroa de Cristo e utilizada para ornamentação, cerca viva, planta medicinal e moluscicida (Figura 7). Destaca-se essa última ação, sendo utilizada em concentrações menores que 0,5 mg/L, oito vezes menor que a dose letal para peixes (VASCONCELLOS & SCHALL, 1986).

Segundo a OMS para o uso de fitoquímicos como moluscicidas são necessários os seguintes requisitos: serem ativos em baixas concentrações (menor que 20 mg/L), apresentar crescimento anual, atividade moluscicida em partes de fácil regeneração na planta e utilização preferencial em extratos aquosos. Nesse sentido, o látex de *Euphorbia milii* var. *hislopii* (= *E. splendens*) (Coroa de Cristo) é o principal candidato vegetal a ser utilizado em programas oficiais de controle, pois contempla todos os itens preconizados.



Figura 7: *Euphorbia milii* (syn. *splendens*) var. *hislopii* (MS, 2007).

Estudos com a espécie *Euphorbia milii* var. *hislopii* tem apresentado bons resultados como moluscicida em diferentes espécies de moluscos de importância médico e veterinária (VASCONCELLOS & SCHALL, 1986; GIOVANELLI et al., 2001; VASCONCELLOS & AMORIN, 2003; OLIVEIRA, 2007; MELLO-SILVA et al., 2011). O produto é natural, biodegradável e possui baixo custo em sua obtenção, tendo sido patenteado pela Fiocruz na década de 90 (VASCONCELLOS & SCHALL, 1986). Em concentrações subletais atua seletivamente em moluscos infectados, reduz as formas infectantes miracídeos e cercárias e influencia diretamente a dinâmica do ciclo do parasito em condições experimentais. Além disso, recentemente observou-se o potencial esquistossomostático de *E. milii* alterando as características dos vermes

adultos em detrimento de sua ação em cercárias de *S.mansoni*(MELLO-SILVA et al., 2011;LIMA et al., 2012; AUGUSTO et al., 2015, 2016).

O látex de *E. milii* possui em sua composição uma substância capaz de gerar uma resposta tóxica de irritabilidade (MARSTON & HECKER, 1983; 1984) e uma ação embrio-fetotóxica em ratos expostos a concentração de 125 mg/kg, superior em mais de 100% a dose letal para moluscos (SCHALL et al., 1991). Não foi observado efeito carcinogênico, mutagênico sobre *Salmonella typhimurium* e ação tóxica em organismos não alvos quando em concentrações utilizadas para moluscos hospedeiros intermediários (OLIVEIRA-FILHO et al., 2000).

Moluscidas, em geral, podem ocasionar alterações comportamentais, devido ao estresse químico. Estudos comportamentais em moluscos hospedeiros sob a ação de moluscidas são escassos e importantes, pois podem manipular o comportamento dos moluscos e em decorrência alterar a dinâmica da cadeia alimentar, promovendo desequilíbrio no ecossistema. Além disso, moluscidas são preconizados como uma das ações para o controle da esquistossomose.

Tendo em vista que as alterações comportamentais fornecerão novos dados para estudos epidemiológicos e de controle da transmissão da esquistossomose, além de servir como indicador de estresse e de qualidade da água, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade locomotora e reprodutiva de *Biomphalaria glabrata* sob duas condições de estresse: a infecção parasitária por *S. mansoni* e a ação de um moluscida natural, o látex de *Euphorbia milii* var. *hislopii*. Os capítulos estão organizados apresentando a seguinte ordem:

CAPÍTULO I- Mudanças no comportamento locomotor e reprodutivo de *Biomphalaria glabrata* infectada por *Schistosoma mansoni*;

CAPÍTULO II- Resposta Comportamental de *Biomphalaria glabrata* exposta à concentração subletal (CL₅₀) do látex de *Euphorbia milii* var. *hislopii*.

2- CAPÍTULO I

Mudanças no comportamento locomotor e reprodutivo de *Biomphalaria glabrata* infectada por *Schistosoma mansoni*

Artigo Publicado. Anexo 1

ALBERTO-SILVA, A. C.; SANTOS, E. G. N.; SANTOS, C. P.; MELLO-SILVA, C. C. Changes in the locomotory and reproductive behavior of *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni*. **Experimental Parasitology**, v. 153, p. 68–74, 2015.

Mudanças no comportamento locomotor e reprodutivo de *Biomphalaria glabrata* infectada por *Schistosoma mansoni*

RESUMO

A infecção e desenvolvimento de um parasito podem causar mudanças fisiológicas, morfológicas e comportamentais no seu hospedeiro. As alterações na atividade locomotora de um hospedeiro induzida pelos seus parasitos podem também influenciar o ciclo de vida de ambos, hospedeiro e parasito, no ambiente. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade locomotora de *Biomphalaria glabrata*, antes e após a infecção experimental pelo *Schistosoma mansoni*, relacionando com a eliminação de cercária. Além disso, os parâmetros reprodutivos de *B. glabrata* infectada foram analisados durante os períodos pré-patente e patente da infecção. A atividade locomotora foi registrada usando o sistema de biomonitoramento por análise de imagem Videomex V®. Foram analisados cinco parâmetros: 'Distância percorrida', 'Tempo ambulatorial', 'Tempo estereotipado', 'Tempo em repouso' e 'Velocidade média'. O número de cercárias eliminadas foi contado duas vezes, 45 e 52 dias após a infecção. Os parâmetros reprodutivos de *B. glabrata* infectada analisados foram o número de massas ovíferas, de ovos e de moluscos eclodidos. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa R. Dos 69 moluscos infectados com *S. mansoni*, 33 (47,8%) eliminaram cercárias ("positivo") e 36 (52,2%) ("exposto") não eliminaram cercárias até o final do experimento. A atividade locomotora de todos os moluscos aumentou significativamente após a infecção com *S. mansoni*. Contudo, quando os moluscos "positivo" e "exposto" foram comparados, os que eliminaram cercárias foram menos móveis. Com relação à reprodução, 84,8% (28/33) dos moluscos "positivos" e 27,7% (10/36) dos "expostos" não conseguiram restabelecer o número de massas ovíferas durante o período patente. O número de cercárias eliminadas individualmente por cada molusco "positivo" apresentou uma relação positiva com o 'Tempo estereotipado' e uma relação negativa com o número de ovos. Concluímos que a infecção com *S. mansoni* afeta o comportamento locomotor e reprodutivo de *B. glabrata*. O número de cercárias eliminadas está diretamente associado com a redução/interrupção na postura de ovos e com um aumento no movimento aleatório.

Palavras-chave: Comportamento, *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni*

Changes in the locomotory and reproductive behavior of *Biomphalaria glabrata* infected by *Schistosoma mansoni*

ABSTRACT

The infection and development of a parasite may cause physiological, morphological and behavioral changes in its host. Changes in the locomotory activity of a host induced by their parasites may also influence the life-cycles of both host and parasite in the environment. The aim of the present work was to evaluate the locomotory activities of *Biomphalaria glabrata* before and after an experimental infection with *Schistosoma mansoni* relating to the shedding of cercariae. In addition, the reproductive parameters of infected *B. glabrata* were analyzed during the prepatent and patent periods of the infection. The locomotory activity was recorded using an image analysis biomonitoring system based on a Videomex V@. Five parameters were analyzed: 'Distance traveled', 'Ambulatory time', 'Stereotypic time', 'Resting time' and 'Average speed'. The number of shed cercariae was counted twice at 45 and 52 days post-infection. The reproductive parameters of infected *B. glabrata* analyzed were the numbers of egg masses, eggs and hatched snails. All statistical analyses were performed using the R program. Of the 69 snails infected with *S. mansoni*, 33 (47.8%) shed cercariae ('positive') and 36 (52.2%) ('exposed') failed to exhibit any cercarial shedding prior to the end of the experiment. The locomotory activity of the all snails increased significantly after infection with *S. mansoni*. However, when the 'positive' and 'exposed' snails were compared, the former, shedding cercariae, were less motile. With regard to reproduction, 84.8% (28/33) of the 'positive' and 27.7% (10/36) of the 'exposed' snails failed to lay egg masses during patent period. The number of cercariae individually shed by each 'positive' snail presented a positive relation with 'Stereotypic time' and a negative relation with egg laying. Our findings highlight the way in which infection with *S. mansoni* affects the locomotory and the reproductive behavior of *B. glabrata*. The number of cercariae shed is directly associated with the reduction/interruption in egg-laying and with an increase in random movement.

Keywords: Behavior, *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni*

2.1- INTRODUÇÃO

Alterações fenotípicas, fisiológicas, comportamentais e morfológicas têm sido descritas para *Biomphalaria glabrata* (Say 1818), principal hospedeiro intermediário de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 no Brasil, em relação a diferentes situações, como infecção parasitária, fome e estivação (FARO et al., 2013.;MELLO-SILVA et al., 2010, 2011).

Mudanças na atividade locomotora de *B. glabrata* infectada com *S. mansoni* foram estudadas por vários autores, incluindo movimentos em relação a vários estímulos, tais como a luz, profundidade e utilização de moluscidas (JURBERG et al., 1987, 1988, 1995; PIERI & JURBERG, 1981; SARQUIS et al., 1998). Boissier et al. (2003) relataram que moluscos não infectados se movem por distâncias maiores, são mais rápidos e apresentam períodos mais curtos de repouso em comparação aos moluscos infectados. Estes autores mostraram também, em um experimento específico de atração que moluscos infectados atraem outros moluscos infectados e não infectados, promovendo agregação, sugerindo, assim, que este comportamento possa aumentar a transmissão do parasito.

Com relação aos parâmetros reprodutivos, Faro et al. (2013) realizando um estudo completo do processo de castração parasitária em *B. glabrata* infectada com *S. mansoni*. Durante o período patente, observaram que a atividade reprodutiva foi regulada direta e indiretamente pelas variações bioquímicas e histopatológicas causadas pela fase de desenvolvimento do trematódeo. No entanto, a castração parasitária não se correlacionou com a carga parasitária ou com parâmetros locomotores. Experimentos que associam atividade reprodutiva e locomotora utilizando o modelo *Biomphalaria/Schistosoma* ainda não foram descritos. Então estes são importantes para elucidar a influência da infecção de *S. mansoni* no comportamento do hospedeiro intermediário e seus possíveis efeitos sobre a transmissão do parasito.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade locomotora de *B. glabrata* usando um sistema de biomonitoramento por análise de imagem antes e depois da infecção experimental com *S. mansoni*, relacionando com a eliminação de cercárias. Além disso, os parâmetros reprodutivos de *B. glabrata* infectadas foram analisados durante os períodos pré-patente e patente da infecção.

2.2- MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1- Nota ética

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética-Animal da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ CEUA-LW-19/13), de acordo com as orientações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

2.2.2- Infecção experimental

Oitenta espécimes de *Biomphalaria glabrata* (linhagem procedente de Belo Horizonte -BH) nascidas e criadas em laboratório, pesando 0,10-0,27 g, com diâmetro de 8-12 mm e aproximadamente 6 meses de idade foram usadas no experimento. Os

moluscos foram alimentados com folhas de alface frescas (*Lactuca sativa* L.) três vezes por semana, mas não foram alimentados durante as 12 horas anteriores a análise de vídeo. Os moluscos foram mantidos individualmente em béqueres numerados com capacidade de 100 ml, contendo água desclorada e temperatura controlada ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) ao longo do experimento. A água foi substituída semanalmente. Cada molusco foi exposto individualmente a 8-10 miracídios de *S. mansoni* (linhagem procedente de Belo Horizonte -BH) obtidos a partir de infecção experimental em camundongos "Swiss" com idade entre 4-6 semanas de acordo com a técnica descrita por Fernandez et al. (2008). Após 5 semanas, os moluscos foram individualmente expostos à luz durante uma hora, em tubos de ensaio com 5 ml de água desclorada, a fim de verificar a existência de cercárias. O número de cercárias eliminadas por molusco foi contado em dois momentos: 45 e 52 dias após a infecção utilizando-se três alíquotas de 0,5 ml de cada frasco. As cercárias foram dispostas em placas de vidro, coradas com lugol e contadas usando microscópio estereoscópico. O número total de cercárias eliminadas por moluscos em cada frasco foi estimado com base no número médio de cercárias contadas a partir das três alíquotas.

2.2.3- Atividade locomotora

O sistema de biomonitoramento por análise de imagem foi baseado no uso do Videomex V® (Columbus Instruments, Ohio, EUA) utilizando o programa *Travelled Distance of Multiple Objects* (MAGALHÃES et al., 2007; SANTOS et al., 2011). O instrumento inclui uma cabine de acrílico utilizada para as gravações, onde se localiza uma câmera de vídeo analógica, com iluminação suave. No interior da cabine há um aquário de vidro opaco ($35 \times 35 \times 25$ cm) com capacidade para 30 litros. Esse possui 4 caixas de acrílico opaco ($9,5 \times 5,5 \times 2$ cm cada) com furos de 3mm, onde os moluscos são mantidos individualmente durante o experimento. Os moluscos são mantidos em água desclorada e filtrada com controle de temperatura ($23,0 \pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$) e pH ($6,8 \pm 1,0$).

O biomonitoramento dos moluscos pelo sistema ocorreu duas vezes durante o experimento: antes da infecção experimental pelo *S. mansoni* (grupo controle) e os mesmos indivíduos foram analisados novamente 40 dias após a infecção. As análises da atividade locomotora dos mesmos moluscos são essenciais para reduzir os riscos de alterações individuais, principalmente às relacionadas ao comportamento. Assim, analisamos individualmente os mesmos moluscos antes da infecção, com movimento normal e sem qualquer agente estressor e depois da infecção com *S. mansoni* durante o período patente. Elucidamos que os moluscos tinham a mesma idade, peso semelhante, mesmo estado nutricional e submetidos a mesma pressão de infecção.

Moluscos infectados que não eliminaram cercárias foram chamados de 'expostos' e os que eliminaram cercárias denominados de 'positivos'. Cada experimento teve a duração de 1 hora e 20 minutos, com os primeiros 20 minutos de aclimação e 1 hora posterior de gravação de vídeo com 60 intervalos de 1 minuto cada. A cada intervalo foram analisados 5 parâmetros da atividade locomotora usados para análise estatística: Distância percorrida que é a distância total em mm percorrida pelo molusco durante o intervalo, Tempo ambulatorial que é o número total em segundos durante o intervalo que o molusco gasta se deslocando, Tempo estereotipado, sendo o tempo total em segundos que o molusco realiza alguma atividade que não seja deslocamento, Tempo de repouso que significa o número total de segundos durante um intervalo que o

molusco não realiza movimentos e velocidade média que é o resultado da distância percorrida dividida pelo tempo ambulatorial.

2.2.4- Parâmetros reprodutivos

Os parâmetros reprodutivos de *Biomphalaria glabrata* infectada analisados foram fecundidade (número de massas ovíferas e número de ovos por molusco) e fertilidade (moluscos eclodidos por ovos) sendo contabilizados de acordo com Mello-Silva et al. (2007) durante o período de 9 semanas após a infecção.

2.2.5- Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa R (R Development Core Team 2014). A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para determinar a diferença entre os pesos dos grupos de molusco (controle x exposto x positivo). Os dados de peso dos moluscos analisados pela ANOVA tinham pressuposto paramétrico (teste de Shapiro-Wilks: $W=0,98$, $p=0,15$). Foi utilizado o Modelo Linear Generalizado (MLG) para estimar a associação entre o número total de cercárias eliminadas por moluscos e as seguintes variáveis: peso, valor de cada parâmetro da atividade locomotora, número total de massas ovíferas, número total de ovos e número total de caramujos eclodidos. O teste do qui-quadrado foi utilizado para investigar o número de ovos viáveis dos moluscos positivos e expostos durante os períodos pré-patente e patente da infecção.

Usou-se a Equação de Estimativa Generalizada (EEG) para avaliar a atividade locomotora do molusco, antes e depois da infecção e para análise dos parâmetros reprodutivos dos moluscos expostos e positivos. O modelo 1, onde foram observados o número de massas ovíferas, ovos e caramujos eclodidos como uma variável resposta. O MLG foi utilizado para calcular as diferenças nos parâmetros reprodutivos de cada amostra durante cada semana da infecção.

Para analisar a atividade locomotora antes e depois da exposição aos miracídios, foi utilizado o modelo 2, que utiliza cada parâmetro da atividade locomotora como uma variável resposta. Assim, analisamos as diferenças nos parâmetros de locomoção dos moluscos dos grupos controle, positivos e expostos e a interação do peso sobre a atividade locomotora. Ambos os modelos foram ajustados para controlar o excesso de dispersão. Os testes estatísticos apresentaram o nível de significância de 5%.

2.3- RESULTADOS

A primeira análise pelo sistema de biomonitoramento foi realizada com 80 moluscos não infectados, logo em seguida, foram expostos individualmente a miracídios de *S. mansoni*. Antes da exposição, estes moluscos foram pesados. Onze moluscos (13,8%) morreram após a infecção. Os 69 restantes (86,2%), após 45 dias de infecção, foram novamente pesados e verificados quanto a eliminação de cercárias. Trinta e três caramujos (47,8%) eliminaram cercárias e foram chamados de positivos. Estes pesaram em média 0,18g, sendo o intervalo entre 0,12-0,27g. Trinta e seis moluscos (52,2%) não eliminaram cercárias até a nona semana pós-infecção, sendo o grupo exposto. A média de peso destes caramujos foi de 0,17 e o intervalo entre 0,10-0,24g. O peso médio do grupo considerado controle composto pelos 69 moluscos não

expostos que, posteriormente, sobreviveram à infecção foi de 0,18 com intervalo entre 0,11-0,27g. A análise de variância não indicou qualquer diferença entre os pesos de todos os moluscos ($F = 1,03$, $p = 0,35$). O peso não influenciou na atividade locomotora dos moluscos de acordo com a análise de EEG.

No que diz respeito à reprodução, 84,8% (28/33) dos moluscos positivos e 27,7% (10/36) dos expostos não colocaram massas ovíferas durante o período patente (teste do qui-quadrado: $X^2 = 5,67$, $p < 0,05$). Dos moluscos positivos, os números médios de massas ovíferas, ovos e caramujos eclodidos foram de 1,4, 10,5 e 4,2, respectivamente. Dos moluscos expostos, os números médios para os mesmos parâmetros foram de 1,9, 13,6 e 4,8, respectivamente. As análises das EEG mostraram uma redução significativa de todos os parâmetros de reprodução de todos os grupos, durante o período de infecção (Tabela 1).

Os moluscos positivos reduziram significativamente o número total de massas ovíferas em comparação com os expostos (-28,8%) (estimativa = -0,52; Wald = 4,36; $p < 0,05$). Embora tenha havido uma redução no número de ovos produzidos (-27,0%) (estimativa = 0,10; Wald = 0,55; $p > 0,05$) e moluscos eclodidos (-20,1%) (estimativa = -0,21; Wald = 0,45; $p > 0,05$) eles não foram significativos. É interessante que os dados semanais demonstraram que os moluscos positivos tiveram um decréscimo de massas ovíferas e ovos no início (até a terceira semana de infecção), mas em relação à eclosão este foi estendido até a quarta semana. Após este período, todos os valores médios tornaram-se estáveis até o final do experimento. Da mesma forma, os moluscos expostos mostraram uma diminuição significativa no número de massas ovíferas, ovos produzidos e moluscos eclodidos, até a quarta semana, posteriormente, estes parâmetros se mantiveram estáveis (Fig. 1-3).

Tabela 1. Avaliação dos parâmetros reprodutivos dos caramujos positivos e expostos em relação ao número de massas ovíferas, ovos e caramujos eclodidos ao longo de nove semanas.

	Estimativa	Wald	p-valor
Nº de massas ovíferas			
Positivo	-0,76	18,57	<0,05
Exposto	-0,40	16,04	<0,05
Ovos			
Positivo	-0,47	12,4	<0,05
Exposto	-0,38	15,1	<0,05
Caramujos eclodidos			
Positivo	-0,31	3,06	<0,05
Expostos	-0,27	7,47	<0,05

A atividade locomotora de cada indivíduo de *Biomphalaria glabrata* foi avaliada pela EEG antes e depois da infecção experimental. Em geral, todos os caramujos infectados (expostos e positivos) aumentaram significativamente a atividade locomotora e diminuíram seu tempo de repouso, em comparação aos não expostos (grupo controle). Os valores médios dos parâmetros locomotores dos caramujos não expostos (controle) foram: Distância percorrida 2,9 (\pm 8,8) mm, Tempo ambulatorial 4,3 (\pm 5,6) segundos, Tempo estereotipado 22,6 (\pm 14,9) seg, Tempo de repouso de 30,5 (\pm 18,2) segundos e Velocidade média de 0,35 (\pm 0,5) mm/seg. Os moluscos expostos possuem valores médios de Distância percorrida 3,9 (\pm 8,8) mm, Tempo ambulatorial 6,1 (\pm 5,4) segundos, Tempo estereotipado 27,6 (\pm 12,6) segundos, Tempo de repouso de 21,1 (\pm 13,1) segundos e Velocidade média de 0,4 (\pm 0,4) mm/seg. Os moluscos positivos apresentam os seguintes valores médios de Distância percorrida 2,8 (\pm 5) mm, Tempo de ambulatorial 5,3 (\pm 4,3) segundos, Tempo estereotipado 28,5 (\pm 11,7) segundos, Tempo de repouso de 23,5 (\pm 13,2) segundos e Velocidade média de 0,4 (\pm 0,3) mm / seg.

A comparação entre os moluscos não-expostos e expostos mostrou que estes últimos exibiram um aumento na sua Distância percorrida (estimativa = 0,46, Wald: 4,06, $p < 0,05$), Tempo ambulatorial (estimativa = 0,59, Wald: 4,24, $p < 0,05$), o Tempo estereotipado (estimativa = 0,50; Wald: 3,15, $p < 0,05$) e Velocidade média (estimativa = 0,12; Wald: 3,66; $p < 0,05$), mas uma diminuição no seu Tempo de repouso (estimativa = -0,42; Wald: 4,15; $p < 0,05$). Da mesma forma, comparando os moluscos não-expostos e positivos, estes últimos apresentaram um aumento significativo em sua Distância percorrida (estimativa = 0,34; Wald: 3,04; $p < 0,05$), Tempo ambulatorial (estimativa = 0,51; Wald: 3,69; $p < 0,05$), o Tempo estereotipado (estimativa = 0,62; Wald: 4,39, $p < 0,05$) e Velocidade média (estimativa = 0,09; Wald: 3,17; $p < 0,05$), mas tiveram uma diminuição do seu Tempo de repouso (estimativa = -0,19, Wald: 2,75, $p < 0,05$).

Não foram encontradas diferenças entre os moluscos positivos e os expostos em relação à Distância percorrida (estimativa: 0,12; Wald: 1,16; $p > 0,05$), Tempo ambulatorial (estimativa = 0,07; Wald: 0,62; $p > 0,05$), Tempo estereotipado (estimativa: 0,12; Wald: 1,06, $p > 0,05$) e Velocidade média (estimativa: 0,02, Wald: 0,90, $p > 0,05$), com exceção do Tempo de repouso, o que foi significativamente maior para os moluscos positivos (estimativa: 0,22; Wald: 2,33; $p < 0,05$) (Fig. 4-8).

Após duas triagens da infecção, realizadas entre 45-52 dias após a infecção, o número médio de cercárias foi de 207. Não houve diferença significativa no número de cercárias eliminadas em relação à Distância percorrida, Tempo ambulatorial, Velocidade média ou Tempo de repouso. No entanto, uma relação positiva foi encontrada para o Tempo estereotipado (estimativa = 0,15; Wald = 2,75; $p = 0,01$).

Avaliamos o número de cercárias eliminadas associando aos parâmetros de reprodução do molusco, o número de ovos mostrou uma relação negativa (estimativa = -0,01; Wald = 2,35; $p = 0,02$) não houve relação significativa com o número de massa ovígeras e moluscos eclodidos (todos $p > 0,05$) (Fig. 9-10).

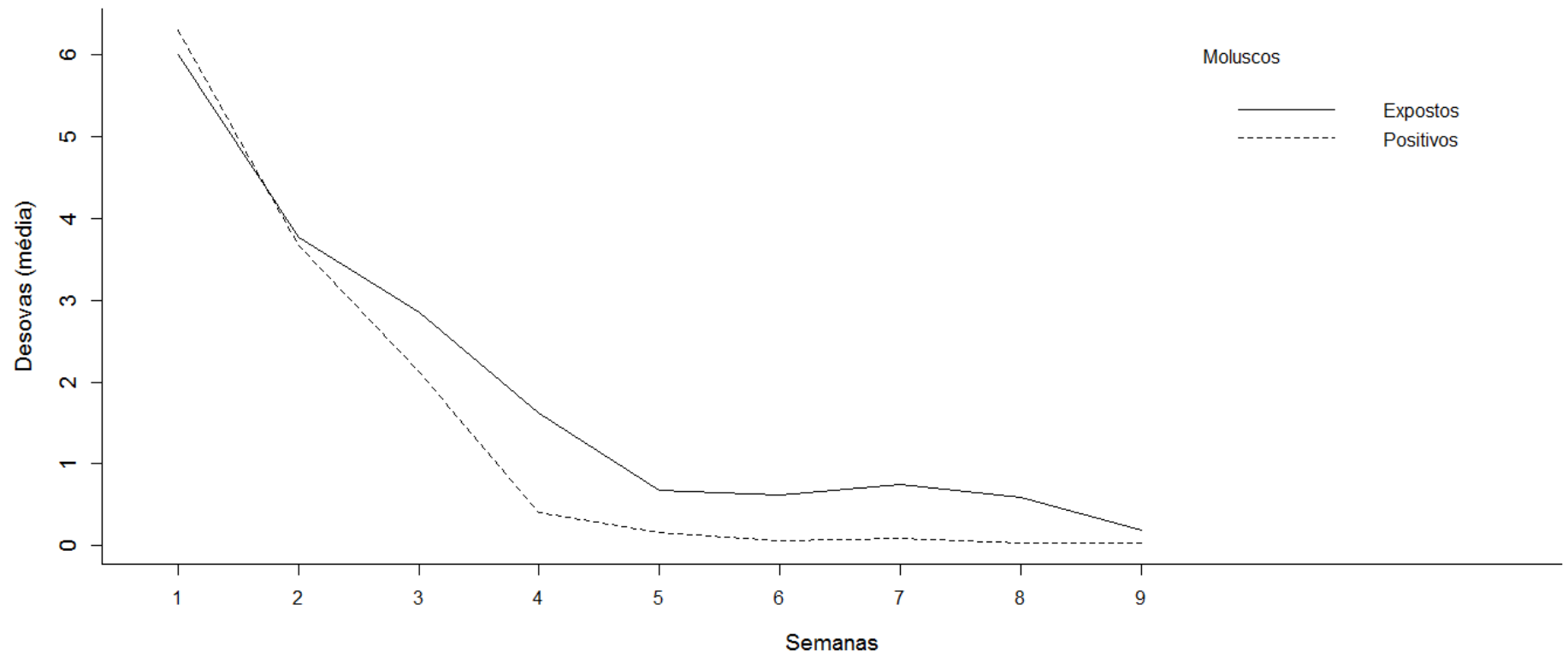


Fig. 1. Semanas de análises dos parâmetros reprodutivos de *Biomphalaria glabrata* infectada com *Schistosoma mansoni*. Massas ovíferas (média).

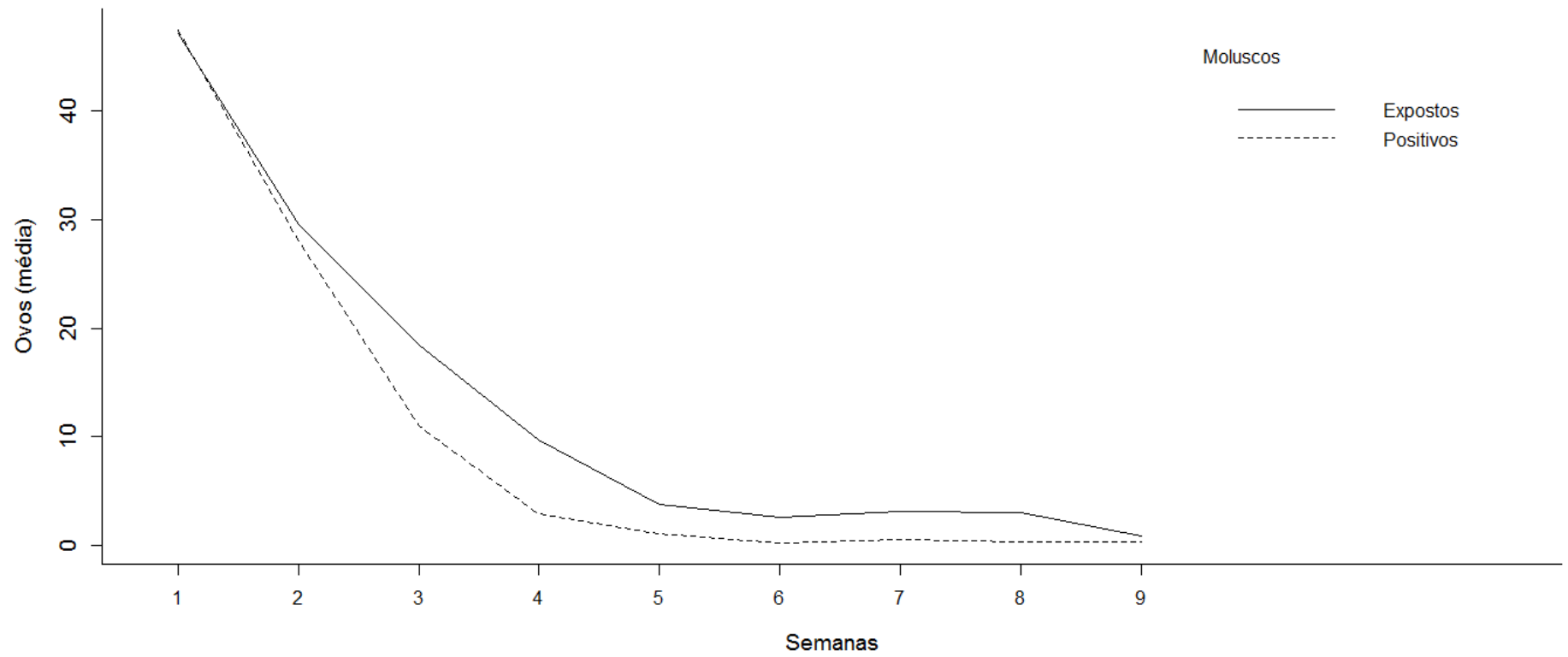


Fig. 2. Semanas de análises dos parâmetros reprodutivos de *Biomphalaria glabrata* infectada com *Schistosoma mansoni*. Ovos (média).

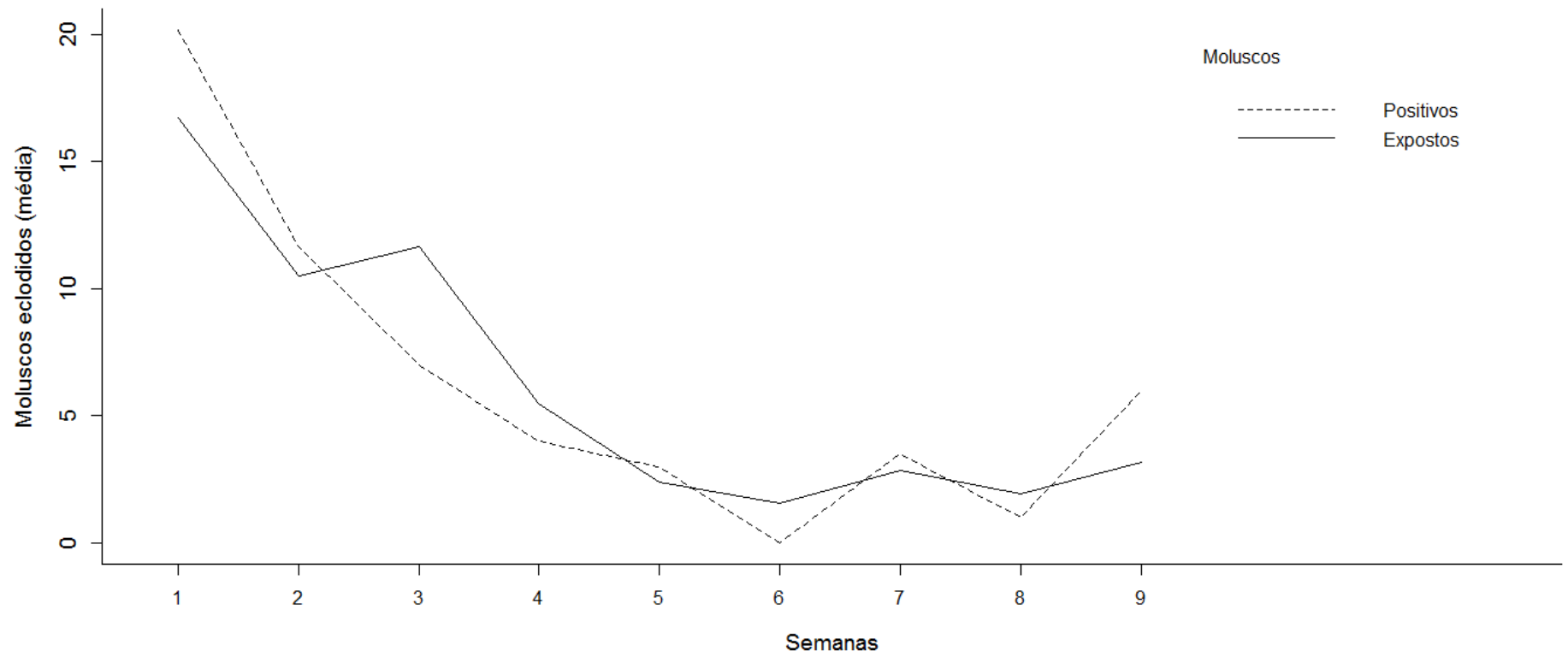


Fig. 3. Semanas de análises dos parâmetros reprodutivos de *Biomphalaria glabrata* infectada com *Schistosoma mansoni*. Moluscos eclodidos (média).

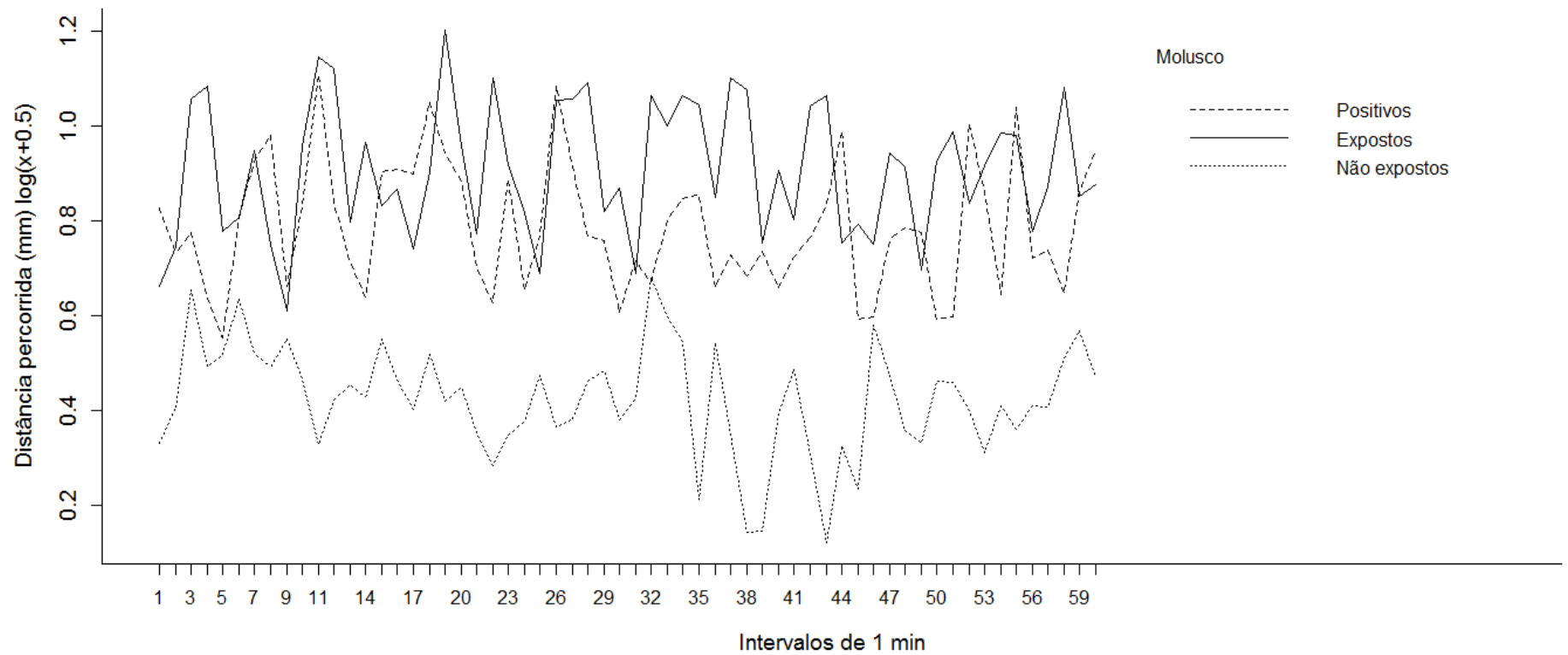


Fig. 4. Comparação entre os gráficos de biomonitoramento de *Biomphalaria glabrata* (Positivo, Exposto e Não exposto) infectado com *Schistosoma mansoni*, em 60 intervalos de 1 min de monitoramento da Distância percorrida (mm).

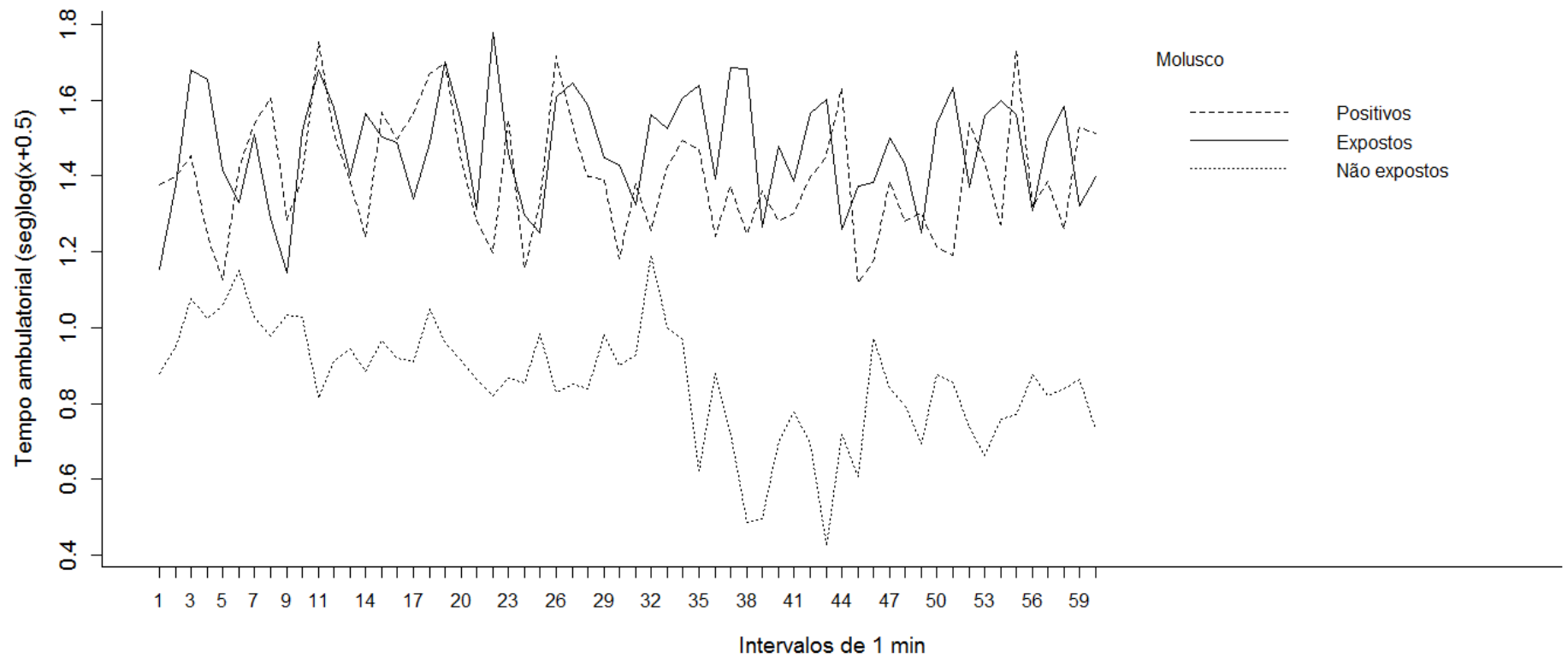


Fig. 5. Comparação entre os gráficos de biomonitoramento de *Biomphalaria glabrata* (Positivo, Exposto e Não exposto) infectado com *Schistosoma mansoni*, em 60 intervalos de 1 min de monitoramento do Tempo ambulatorial (s).

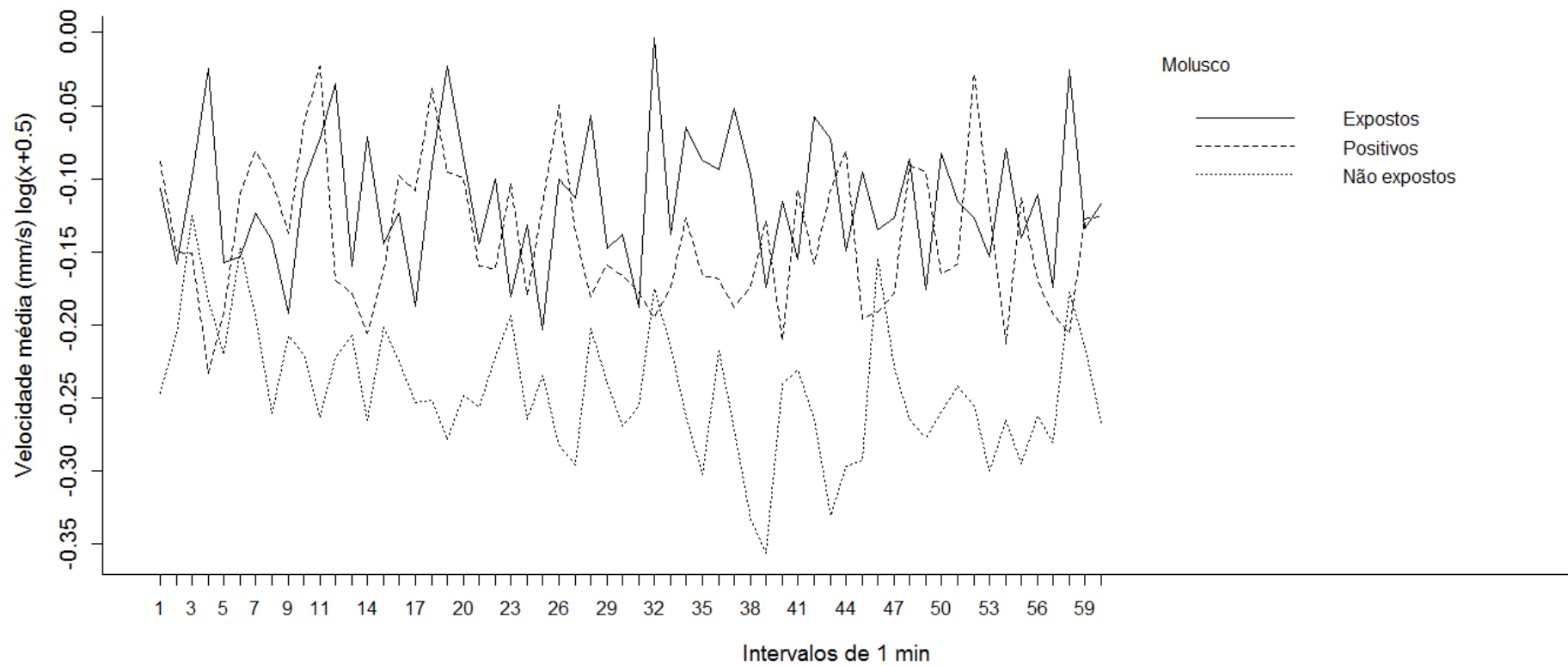


Fig. 6. Comparação entre os gráficos de biomonitoramento de *Biomphalaria glabrata* (Positivo, Exposto e Não exposto) infectado com *Schistosoma mansoni*, em 60 intervalos de 1 min de monitoramento da Velocidade média (mm/s).

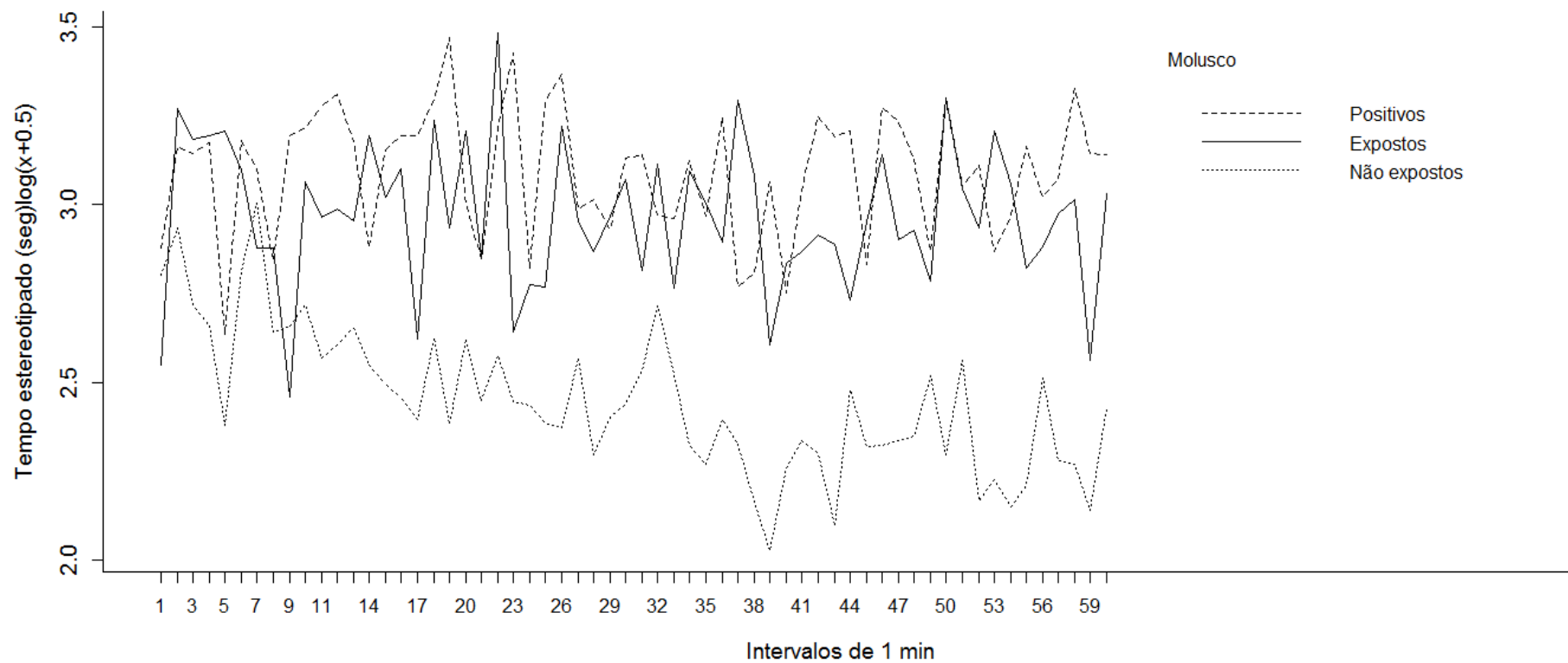


Fig. 7. Comparação entre os gráficos de biomonitoramento de *Biomphalaria glabrata* (Positivo, Exposto e Não exposto) infectado com *Schistosoma mansoni*, em 60 intervalos de 1 min de monitoramento do Tempo estereotipado (s).

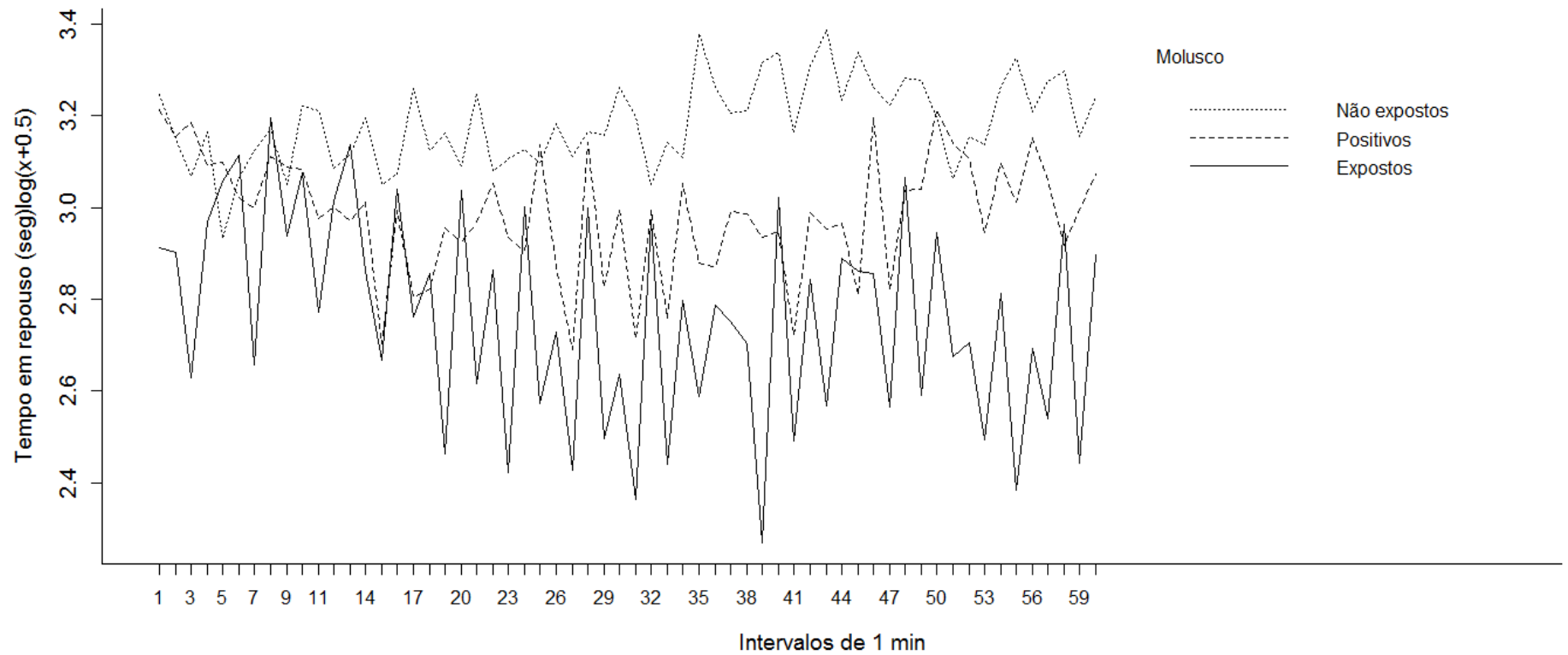


Fig. 8. Comparação entre os gráficos de biomonitoramento de *Biomphalaria glabrata* (Positivo, Exposto e Não exposto) infectado com *Schistosoma mansoni*, em 60 intervalos de 1 min de monitoramento do Tempo em repouso (s).

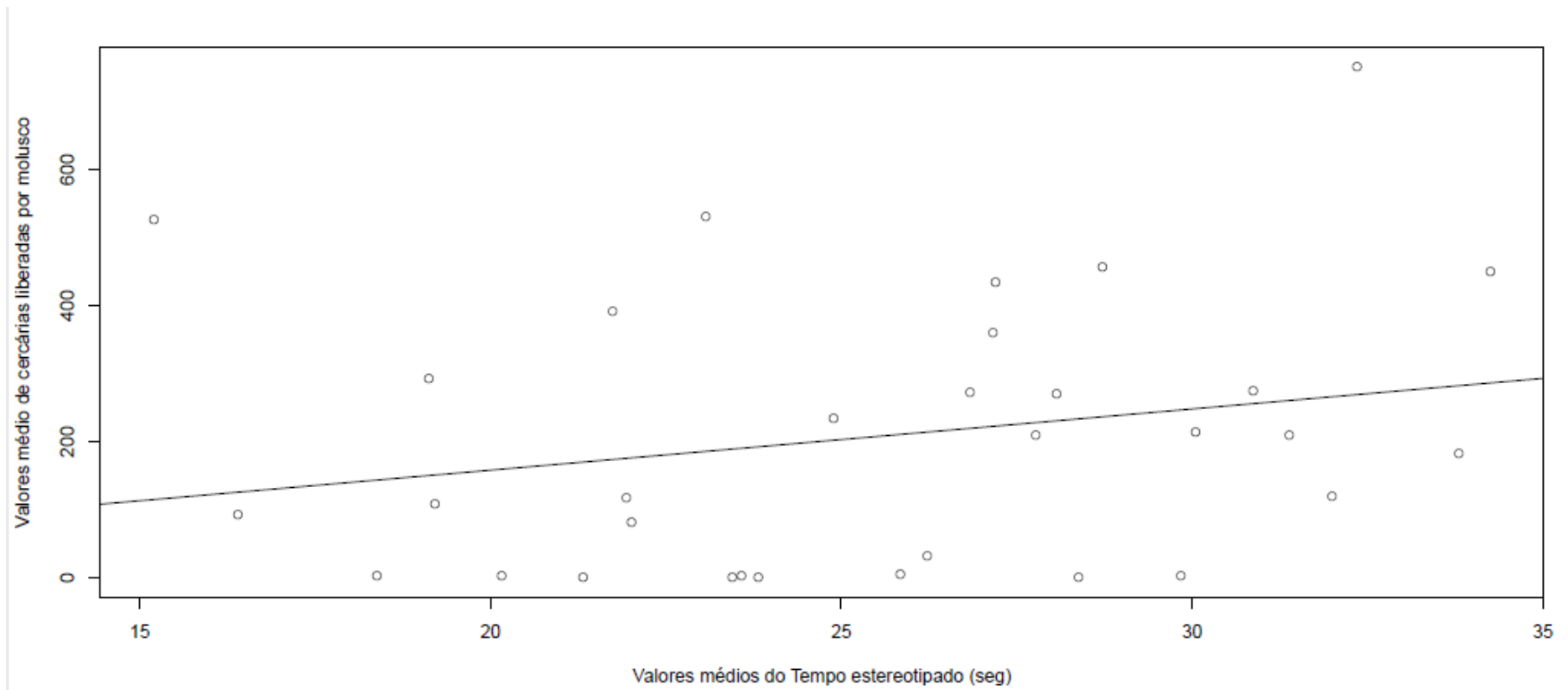


Fig. 9. Correlação entre o Tempo estereotipado do grupo positivo de *Biomphalaria glabrata* e o número de cercárias eliminadas.

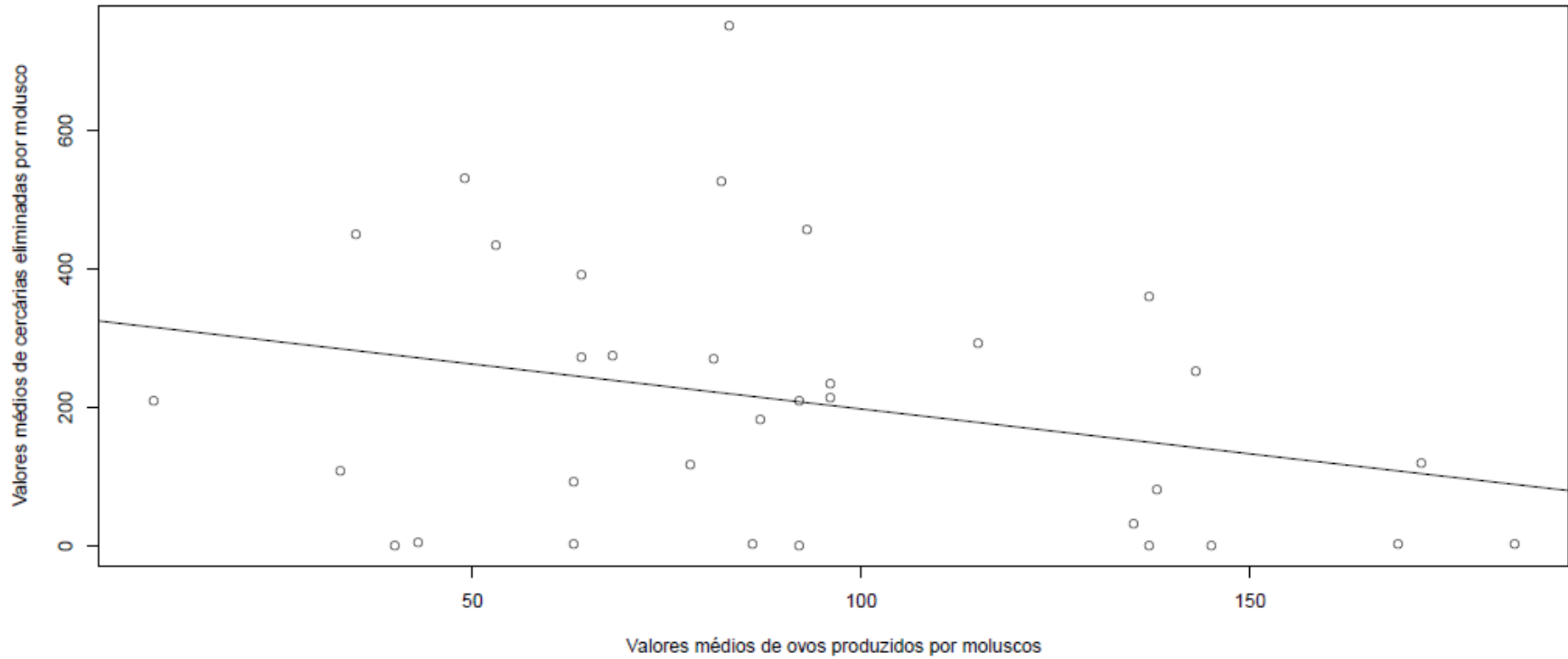


Fig. 10. Correlação entre o número de ovos do grupo positivo de *Biomphalaria glabrata* e o número de cercárias eliminadas.

2.4- DISCUSSÃO

Os parasitos, de um modo geral, são conhecidos por terem evoluído na capacidade de modular o comportamento dos seus hospedeiros, a fim de melhorar o seu sucesso reprodutivo (MOORE, 2002). Eles podem induzir fenômenos multidimensionais, como mudanças comportamentais, morfológicas e fisiológicas (POULIN, 2010, 2013; POULIN & THOMAS, 2008). A presente análise avalia pela primeira vez os parâmetros reprodutivos *B. glabrata* associando com a atividade locomotora e a influência da infecção por *S. mansoni*, que proporciona uma nova percepção da relação parasito-hospedeiro sobre a influência de *S. mansoni*.

O sistema de biomonitoramento de análise de imagem tem sido usado para entender o comportamento de diferentes hospedeiros de helmintos parasitos. Santos et al. (2013) utilizaram a mesma metodologia (Videomex V®) para estudar a atividade locomotora do molusco de água doce *Melanoides tuberculatus* (Müller 1774), comparando um grupo livre de infecção com outros parasitados pelo trematódeo *Centrocestus formosanus* (Nishigori 1924). Estes autores mostraram que os moluscos infectados, possuem uma redução e irregularidade em seus movimentos, sugerindo que os moluscos com menos motilidade poderiam influenciar o ciclo de vida de *C. formosanus*, concentrando a eliminação de cercárias em uma área mais restrita. Este sistema de biomonitoramento também foi testado usando peixes infectados com metacercárias, o que resultou em uma diminuição significativa no comportamento de natação dos peixes correlacionados com a intensidade parasitária, sugerindo uma possível perturbação na relação predador-presa no ambiente natural (SANTOS & SANTOS, 2013). O sistema de biomonitoramento por análise de imagem baseado no Videomex V® é usado pela primeira vez neste estudo para avaliar a atividade locomotora de *B. glabrata*, onde se demonstra claramente os efeitos da infecção pelo trematódeo *S. mansoni*.

Boissier et al. (2003) realizaram um estudo comparativo do comportamento de *B. glabrata* não infectada em comparação com infectada por *S. mansoni* usando um aquário com o fundo dividido em centímetros. Os autores observaram os movimentos dos moluscos individualmente durante 15 minutos, utilizando o aparelho de *Y-maze*. Baseado exclusivamente em observações visuais mostraram que os moluscos inicialmente infectados se movimentavam menos que os não infectados. No entanto, a atividade locomotora e o comportamento de repouso dos moluscos não puderam ser medidos com precisão e poderia ser influenciado pela taxa de metabolismo de cada indivíduo, um fator que não foi levado em consideração. No entanto, eles observaram um "comportamento de agregação", onde ambos os caramujos: não infectados e infectados foram atraídos por moluscos infectados em laboratório e, possivelmente, essas mesmas condições poderiam ocorrer em campo, como relatado por Sire et al. (1999). Seguindo El-Ansary e Al-Daihan (2006), verifica-se que uma redução da atividade locomotora de moluscos *Biomphalaria* poderia estar associada com uma diminuição no metabolismo.

Alterações no metabolismo de *B. glabrata* infectados com *S. mansoni* tem sido relatada por Becker (1980, 1983), os moluscos mobilizam a reserva de glicogênio na glândula digestiva para a hemolinfa durante o período patente da infecção (período de eliminação de cercárias). Esta mobilização também foi observada em moluscos expostos a moluscidas como *Euphorbia milii* (MELLO-SILVA et al., 2010, 2011).

Estes processos promovem a aceleração do metabolismo, que pode aumentar a atividade locomotora do molusco, tal como observado em nosso experimento.

A redução nos parâmetros reprodutivos de *B. glabrata* observados no presente estudo ocorreu em ambos os grupos de moluscos: expostos e positivos, mas neste último foram mais acentuados. Isto significa que ambos os grupos estavam sob estresse causado pela infecção, mas esta foi mais intensa nos positivos devido ao sucesso na eliminação de cercárias. Assim, o maior número de cercárias está diretamente associada com a redução ou mesmo a interrupção total da produção de ovos. Faro et al. (2013) também relataram a interrupção na postura de ovos de *B. glabrata* durante o período patente e mostrou que ele foi causado por uma diminuição dos recursos energéticos e alterações morfológicas principalmente no ovoteste dos moluscos.

A comparação entre a atividade locomotora de moluscos infectados (exposto e positivo) e do grupo controle, embora medido em milímetros por segundo, mostraram um aumento no deslocamento (Distância percorrida), durante um período mais longo (Tempo ambulatorial) e uma maior velocidade (Velocidade média), juntamente com movimentos aleatórios aprimorados (Tempo estereotipado). Consequentemente, os moluscos infectados diminuíram seu Tempo de repouso. A posterior comparação entre os moluscos positivos e os expostos mostrou que não houve diferença significativa para a maioria dos parâmetros em termos de atividade locomotora. Entretanto, o Tempo de repouso foi significativamente maior nos animais positivos, levando-nos, portanto, a inferir que a pressão da infecção, juntamente com a eliminação de cercárias tornou os moluscos positivos menos móveis do que os expostos. No que diz respeito ao número de cercárias pelos positivos, houve uma correlação positiva com o Tempo estereotipado, indicando um movimento perturbador que não representa um real deslocamento (Tempo ambulatorial). Podemos sugerir que a eliminação de cercárias pode causar um desconforto. Nossos resultados, com base na análise de biomonitoramento, mostraram que, ao contrário de outros estudos (BOISSIER et al., 2003; EL-ANSARY e AL-DAIHAN, 2006), caramujos infectados deslocaram mais do que o grupo controle e moluscos que eliminam cercárias tendem a ser menos móveis do que os que não eliminaram.

Conclui-se que a infecção por *S. mansoni* afeta o comportamento locomotor e reprodutivo de *B. glabrata*. Além disso, o número de cercárias eliminadas está diretamente associado a redução/interrupção da oviposição e do aumento nos movimentos aleatórios.

3- CAPÍTULO II

Resposta Comportamental de *Biomphalaria glabrata* exposta à concentração subletal (CL₅₀) do látex de *Euphorbia milii* var. *hislopii*

Resposta Comportamental de *Biomphalaria glabrata* exposta à concentração subletal (CL₅₀) do látex de *Euphorbia milii* var. *hislopii*

RESUMO

Estudos toxicológicos utilizando moluscos de água doce têm sido realizados com diferentes produtos dissolvidos na água, como moluscicidas aplicados no controle de moluscos hospedeiros intermediários da esquistossomose mansônica. Assim, neste presente trabalho foram verificadas alterações nos parâmetros locomotores e reprodutivos de *Biomphalaria glabrata* expostas à concentração subletal (CL₅₀ - 0,53 mg/L) do látex de *Euphorbia milii* var. *hislopii*. Noventa e seis exemplares de *Biomphalaria glabrata* (cepa BH) foram expostos individualmente a CL₅₀ do látex de *E. milii* durante 24 horas. Os moluscos foram avaliados quanto aos parâmetros locomotores e reprodutivos. Em relação aos aspectos locomotores, os espécimes foram submetidos ao biomonitoramento por análise de imagens (Videomex V®) para registro dos seguintes parâmetros: Distância percorrida, Tempo em repouso, Tempo estereotipado, Tempo ambulatorial e Velocidade média em diferentes momentos: antes da exposição (grupo controle), 1 dia pós exposição (grupo 1 d.p.e.) e 30 dias pós exposição (grupo 30 d.p.e.). As massas ovíferas, ovos e moluscos eclodidos foram contabilizados semanalmente durante 10 semanas, sendo cinco antes da exposição e cinco após a mesma. Como resultados, observamos um decréscimo significativo (p-value < 0,05) de todas as atividades locomotoras dos moluscos do grupo 1 d.p.e. em comparação ao controle. Não houve diferença significativa entre os grupos controle e o 30 d.p.e. Comparando os grupos pós exposição (1 dia e 30 dias), foi observado uma redução na atividade locomotora do grupo 1 d.p.e. Em relação aos parâmetros reprodutivos, a relação ovos/massa ovífera diminuiu na semana seguinte a exposição (6ª semana) enquanto houve aumento na taxa de eclosão. Após trinta dias, estes parâmetros reprodutivos foram similares aos observados nestes mesmos moluscos antes da exposição. Houve, no entanto, redução no número de moluscos eclodidos após a exposição até o final do experimento (10ª semana). Conclui-se que o látex de *E. milii* influencia diretamente os padrões locomotores e reprodutivos de *B. glabrata*, principalmente na primeira semana após a exposição, mas há recuperação dos parâmetros locomotores e reprodutivos após 30 dias de exposição.

Palavras-chave: Comportamento, ambiente límnico, Mollusca.

Behavioral response of *Biomphalaria glabrata* exposed to sublethal concentration (CL₅₀) of *Euphorbia milii* var. *hislopii* latex

ABSTRACT

Toxicological studies using freshwater mollusks have been realized with different products dissolved in freshwater, as molluscicides applied in control of intermediate hosts of schistosomiasis. In this study were verified changes in locomotor and reproductive parameters of *Biomphalaria glabrata* exposed to sublethal concentration (LC₅₀ - 0.53 mg / L) of the *Euphorbia milii* var. *hislopii* latex. Ninety-six *Biomphalaria glabrata* (BH strain) were individually exposed to *E.milii* latex LC₅₀ for 24 hours. The snails were evaluated in relation to locomotory and reproductive parameters. Regarding locomotory aspects, the specimens were submitted to biomonitoring for image analysis (Videomex V®) and recorded the following parameters: Distance traveled, Resting time, Stereotypical time, Ambulatory time and Average speed at different times: before exposure (control group), one day after exposure (group 1 d.p.e.) and 30 days after exposure (group 30 d.p.e.). Eggs masses, eggs and hatched mollusks were recorded weekly for 10 weeks, five before the exposition and five after. As a result, we observed a significant decrease (p-value <0.05) of all locomotory activities of the group of 1 d.p.e. snails comparing to the control group. There was no significant difference between the control group and 30 d.p.e. snails group. Comparing the post-exposure groups (1 day and 30 days) was observed a reduction in locomotory activity in 1 d.p.e. snails group. In relation of reproductive parameters, the eggs /eggs masses ratio decreased at the following week after exposure (6 weeks) while there was an increase in the hatching rate. After thirty days, these reproductive parameters were similar to those observed in these same mollusks before exposure. However, the number of hatched mollusks reduced after exposure until the end of the experiment (10 weeks). We conclude that the *E.milii* latex directly influences the locomotory and reproductive parameters of the *B. glabrata*, mainly in the first week after the exposition, but there is recovery of locomotory and reproductive parameters after 30 days of exposure.

Keywords: Behavior, freshwater environments, Mollusca.

3.1- INTRODUÇÃO

A integridade ecológica dos ecossistemas, principalmente os de água doce, tem sido ameaçada, devido ao aumento de dejetos orgânicos e inorgânicos, catástrofes ambientais e mudanças climáticas que afetam direta e indiretamente a sobrevivência da biodiversidade límnic (CHAPIN et al., 2000; LIMA et al., 2001; GALVÃO, 2011). Os organismos aquáticos têm sofrido com as alterações físicas e químicas do ambiente límnic, devido a diversos contaminantes, desde dejetos orgânicos até a bioacumulação de metais pesados, interferindo nos padrões das relações tróficas, em decorrência do fluxo de energia e biomassa. Por consequência, os organismos aquáticos têm sido utilizados como bioindicadores de contaminação ambiental (EATON, 2003; ABÍLIO et al., 2007; QUEIROZ et al., 2008).

Dentre os organismos aquáticos límnicos, destacam-se os moluscos, que são macroinvertebrados bentônicos, utilizados em programas de biomonitoramento, ocupam níveis tróficos intermediários e atuam como elos fundamentais da cadeia alimentar (BODE et al., 2002; ABÍLIO et al., 2007). Neste táxon, os bivalves e gastrópodes têm sido utilizados como bioindicadores da qualidade da água, devido à absorção da mesma pelo tegumento, pela entrada e saída constante de água pelas correntes inalantes e exalantes e por terem altamente conservado o controle e regulação destas vias.

Produtos dissolvidos na água tem sido alvo de estudos toxicológicos utilizando diversos moluscos de água doce (OMS, 1999), pois apesar de serem tolerantes a poluição por material orgânico como fezes, são vulneráveis a outros poluentes mesmo em baixas concentrações (OLIVEIRA-FILHO & PAUMGARTTER, 1997; BODE et al., 2002). O gastrópode pulmonado *Biomphalaria glabrata* tem sido utilizado como modelo para estes estudos, pois apresenta ampla distribuição geográfica em diferentes ecótopos (CARVALHO et al., 2008), abundância numérica por ser um estrategista R (ODUM & BARRET, 2007), mobilidade limitada, ciclo de vida longo (aproximadamente um ano em condições naturais), fácil manutenção em condições laboratoriais, sendo utilizado em pesquisas experimentais (HELLAWELL, 1986; BICUDO & BICUDO, 2004; QUEIROZ et al., 2008). É também a principal espécie que atua como hospedeiro intermediário de *Schistosoma mansoni* no Brasil, causador da Esquistossomose mansônica, principal doença helmíntica no mundo (HOTEZ et al., 2009).

Compostos químicos de origem sintética e natural, que são veiculados na água para o controle de moluscos são considerados fatores de estresse para os mesmos. O composto químico mais utilizado em campanhas para o controle da transmissão da esquistossomose é a Niclosamida, comercializada como Bayluscide®. Este produto provoca alta mortalidade de peixes, entre outros organismos não alvos e possui efeito carcinogênico e genotóxico para mamíferos (VEGA et al., 1988). Devido ao impacto deste produto no ambiente, seu uso é preconizado pelo Ministério do Meio Ambiente apenas para áreas de alta taxa de prevalência (MMA, 2006).

Na busca de compostos eficientes para o controle de moluscos, que sejam naturais, biodegradáveis, de baixo custo, específicos e não tóxicos aos demais organismos da biota, diversos estudos foram realizados, surgindo nos anos 1980, o látex de *Euphorbiamilii* var. *hislopilii*. Atualmente, a literatura apresenta mais de 50 artigos específicos para este produto, demonstrando sua eficiência no controle de moluscos em concentrações letais menores que 5,0 mg/L (MELLO-SILVA et al., 2006, MELLO-SILVA et al., 2011; LIMA et al., 2012). Apresenta fotodegradação ao longo de trinta dias (SCHALL et al., 1992; OLIVEIRA-FILHO & PAUMGARTTEN, 1997) e não

possui efeito carcinogênico, mutagênico e embriotóxico para mamíferos nas concentrações letais para moluscos (VASCONCELLOS & AMORIM, 2003). Além disso, reduzem significativamente a eliminação de larvas de *S. mansoni* nos recursos hídricos pelos moluscos, podendo ser utilizada como produto natural para o controle da esquistossomose (AUGUSTO et al., 2015).

Apesar da biodegradabilidade do látex de *Euphorbia milii* var. *hislopii* e de sua importância epidemiológica, aspectos importantes da ação tóxica do produto como as atividades locomotoras e as disfunções reprodutivas para os moluscos aquáticos ainda não tinham sido observadas, sendo o objeto de estudo do presente trabalho.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1- Nota ética

Esta pesquisa foi aprovada pelo comitê de ética animal da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/IOC 016/2015), de acordo com as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3.2.2.-Coleta e liofilização do látex de *Euphorbia milii*

A coleta do látex de *E. milii* foi realizada na localidade Ilha do Governador (22°48'09''S/ 43°12'35''W), no dia 04 de maio de 2015, Rio de Janeiro, Brasil. A preparação de solução aquosa e a determinação da concentração subletal (CL₅₀) seguiram os procedimentos descritos por Vasconcellos e Amorim (2003). A CL₅₀ foi determinada em 0,53 mg/L neste experimento. Foram liofilizados 5mL de amostras do látex *in natura* de acordo com Augusto et al. (2016), dois dias após a coleta.

3.2.3 Manutenção e exposição de *Biomphalaria glabrata* ao látex de *Euphorbia milii*

Para a realização do experimento foram usados 96 espécimes de *B. glabrata* (linhagem procedente da Lagoa da Pampulha/Belo Horizonte-BH) com seis meses de vida, criadas em condições laboratoriais e cedidas pelo Laboratório de Esquistossomose (DCB/ENSP/Fiocruz). Os espécimes apresentaram peso total que variou de 0,10 a 0,27g e 8-12 mm de diâmetros de concha. A manutenção dos moluscos e os experimentos foram realizados no Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental (LAPSA/ IOC/Fiocruz). Os moluscos foram mantidos individualmente em béqueres de 100 ml com água desclorada, que foi substituída semanalmente. Pedacos de isopor foram colocados na água para a postura dos ovos e substituídos semanalmente. A temperatura foi mantida na faixa de 25 a 28°C. Os moluscos foram alimentados diariamente com folhas de alface frescas (*Lactuca sativa* L.), exceto no dia de exposição ao látex de *E. milii* var. *hislopii* das análises das atividades locomotoras.

Os espécimes de *B. glabrata* foram expostos individualmente à concentração subletal (CL₅₀ - 0,53 mg/L) do látex de *E. milii* por um período de 24 horas. Placas de isopor contendo furos foram colocadas sobre a solução para impedir o escape dos moluscos. Após este período, os espécimes foram retirados da solução contendo látex e colocados novamente em água desclorada para análises posteriores.

3.2.4. Atividade locomotora de *Biomphalaria glabrata*

Para análise da atividade locomotora dos moluscos antes e após a exposição ao látex liofilizado de *E. milii* var. *hislopai* foi utilizado um sistema de biomonitoramento por análise de imagens, Videomex V® (Columbus Instruments, Ohio, EUA) de acordo com o descrito por Alberto-Silva et al. (2015).

As análises pelo sistema de biomonitoramento foram realizadas com os mesmos animais e ocorreram em três momentos durante o experimento: antes da exposição (grupo controle), 1 dia pós exposição (grupo 1 d.p.e.) e 30 dias pós exposição (grupo 30 d.p.e.). Cada análise pelo Videomex V® teve duração de 1 hora e 20 minutos, com os primeiros 20 minutos de aclimação e 1 hora de gravação de vídeo com 60 intervalos de 1 minuto cada. A cada intervalo foram analisados 5 parâmetros: Distância percorrida, Tempo ambulatorial, Tempo estereotipado, Tempo de repouso e Velocidade média segundo Alberto-Silva et al. (2015).

3.2.5. Parâmetros reprodutivos de *Biomphalaria glabrata*

Foram analisados os seguintes parâmetros reprodutivos por molusco: número total de massas ovíferas, número total de ovos, número de ovos por massa ovífera, número de moluscos eclodidos e taxa de eclodibilidade. A contagem foi realizada semanalmente, cinco semanas antes da exposição ao látex (grupo controle) e cinco semanas após a exposição (grupos 1 d.p.e. e 30 d.p.e.). Todos os parâmetros foram analisados com o auxílio de microscópio estereoscópio. As placas de isopor contendo as massas ovíferas e seus respectivos ovos foram transferidas para placas de Petri devidamente identificadas com a data da oviposição, contendo água desclorada do recipiente de origem, a fim de verificar a eclosão dos moluscos. A eclodibilidade dos moluscos foi observada 15 dias após a data de separação das massas ovíferas, conforme descrito por Alberto-Silva et al. (2015).

3.2.6. Análises estatísticas

Para as análises estatísticas foi utilizado o programa R (R Development Core Team, 2014) com os seguintes pacotes: ‘geepack’ e ‘ggplot2’ (HØJSGAARD et al., 2006; WICKHAM, 2009). A variável “peso dos moluscos” não apresentou distribuição normal, sendo necessária transformação dos dados (Shapiro-test = 0.96 $p < 0.001$). Sendo assim, o teste Willcoxon não paramétrico foi utilizado para determinar diferença entre os pesos dos moluscos antes e pós exposição. Foi utilizada a equação de estimação generalizada (EEG) para verificar diferença entre os parâmetros locomotores dos grupos analisados. O primeiro modelo (1) usou cada parâmetro locomotor como uma variável resposta e sua interação com o peso individual dos moluscos. O segundo modelo (2) calculou as diferenças nos parâmetros reprodutivos dos moluscos (número de massas ovíferas, ovos e moluscos eclodidos) antes e pós exposição ao látex, utilizando cada parâmetro reprodutivo como uma variável resposta e sua interação com o peso individual dos moluscos. Ambos os modelos foram ajustados para controlar o excesso de dispersão e normalização dos resíduos. Finalmente, uma estatística goodness-of-fit e o critério de informação de quasi-verossimilhança (QIC), foi utilizado para avaliar os

modelos (PAN, 2001). O nível de significância assumido para os testes estatísticos foi de 5%.

3.3- RESULTADOS

O estudo de biomonitoramento foi iniciado com 96 moluscos. Após a exposição à CL₅₀ do látex morreram 54 indivíduos (56,25%) e sobreviveram 42 (43,75%). Esses últimos deram prosseguimento ao estudo, terminando o experimento com 27 indivíduos. A análise estatística (EEG) não encontrou nenhuma relação entre o peso dos moluscos e a atividade locomotora para nenhum dos parâmetros analisados, embora tenha sido encontrado um aumento de peso entre o período antes e pós exposição ao látex (Teste Wilcoxon W: 6.237,5; valor p = <0,001).

Antes da exposição ao látex (grupo controle), os moluscos apresentaram os seguintes valores médios para os parâmetros locomotores: 'Distância percorrida' 22,39 (± 13,25) mm, 'Tempo ambulatorial' 2,03 (± 1,18) s, 'Tempo Estereotipado' 42,72 (± 9,14) s, 'Tempo de repouso' 15,24 (± 9,55) s e 'Velocidade média' 9,81 (± 3,04) mm/s. Após um dia de exposição com CL₅₀ do látex, os moluscos apresentaram os seguintes valores médios: 'Distância percorrida' 1,02 (± 3,57) mm, 'Tempo ambulatorial' 0,09 (± 0,32) s, 'Tempo estereotipado' 12,97 (± 17,97) s, 'Tempo de repouso' 46,93 (± 18,12) s e 'Velocidade média' 0,91 (± 3,44) mm /s. Comparando os dois grupos (controle e 1 d.p.e.) observou-se uma diminuição de 95,44% para Distância percorrida, 95,5% para o Tempo ambulatorial, 69,6% para Tempo estereotipado, 90,7% para Velocidade média significativa e um aumento de 307,9% do Tempo de repouso. Todos os valores apresentaram diferença significativa (p <0,05).

Os mesmos moluscos do grupo de 1 d.p.e. foram observados novamente após 30 dias (grupo 30 d.p.e), os valores médios dos moluscos para os parâmetros locomotores analisados foram: 'Distância percorrida' 25,14 (± 15,86) mm, 'Tempo ambulatorial' 2,17 (± 1,37) s, 'Tempo estereotipado' 42,54 (± 11,53) s, 'Tempo em repouso' 13,93 (± 10,67) s e 'velocidade média' 9,54 (± 3,94) mm / s. Comparando os grupos pós expostos com 1 dia e com 30 dias, observou-se que os moluscos com 30 dias aumentaram significativamente a maioria dos parâmetros analisados, tendo reduzido apenas o Tempo de repouso. Entretanto, quando comparamos os parâmetros locomotores dos moluscos 30 d.p.e com os parâmetros locomotores coletados dos mesmos caramujos antes da exposição, não observamos diferença significativa, demonstrando que os moluscos expostos com 30 dias recuperaram a atividade locomotora (valores p > 0,05) (Fig. 1-5).

Em relação aos parâmetros reprodutivos, não foi observada nenhuma influência do peso dos moluscos sobre os parâmetros reprodutivos (todo o valor-p > 0,05). Antes da exposição ao látex de *E.milii*, os moluscos apresentaram os seguintes valores médios analisados durante 05 semanas: 2,69 (± 1,80) massas ovíferas/caramujo, 29,84 (± 23,88) ovos/caramujo, 11,14 ovos/massa ovígera e 10,88 (± 13,54) moluscos eclodidos. Depois de trinta dias de exposição ou 5ª semana pós exposição, os valores médios dos parâmetros reprodutivos foram: 2,60 (± 1,78) massas ovíferas/caramujo, 27,64 (± 26,48) ovos/caramujo, 9,99 ovos/massa ovígera e 7,00 (± 9,51) caramujos eclodidos (Tabela 1). Ressaltamos que na semana seguinte a exposição ao látex de *E. milli* foram encontrados os menores resultados referentes ao número de massas ovígera/caramujo: 1,25; ovos/caramujo: 8,62 e ovos/massa ovígera: 6,89, sendo diferente significativamente da última semana de observação antes da exposição (5ª semana antes da exposição) e da 2ª semana pós exposição. Nesta semana também observamos uma

menor postura de ovos com maior taxa de eclosão (62%). Esta taxa foi a maior em todas as semanas observadas (Fig. 6-8).

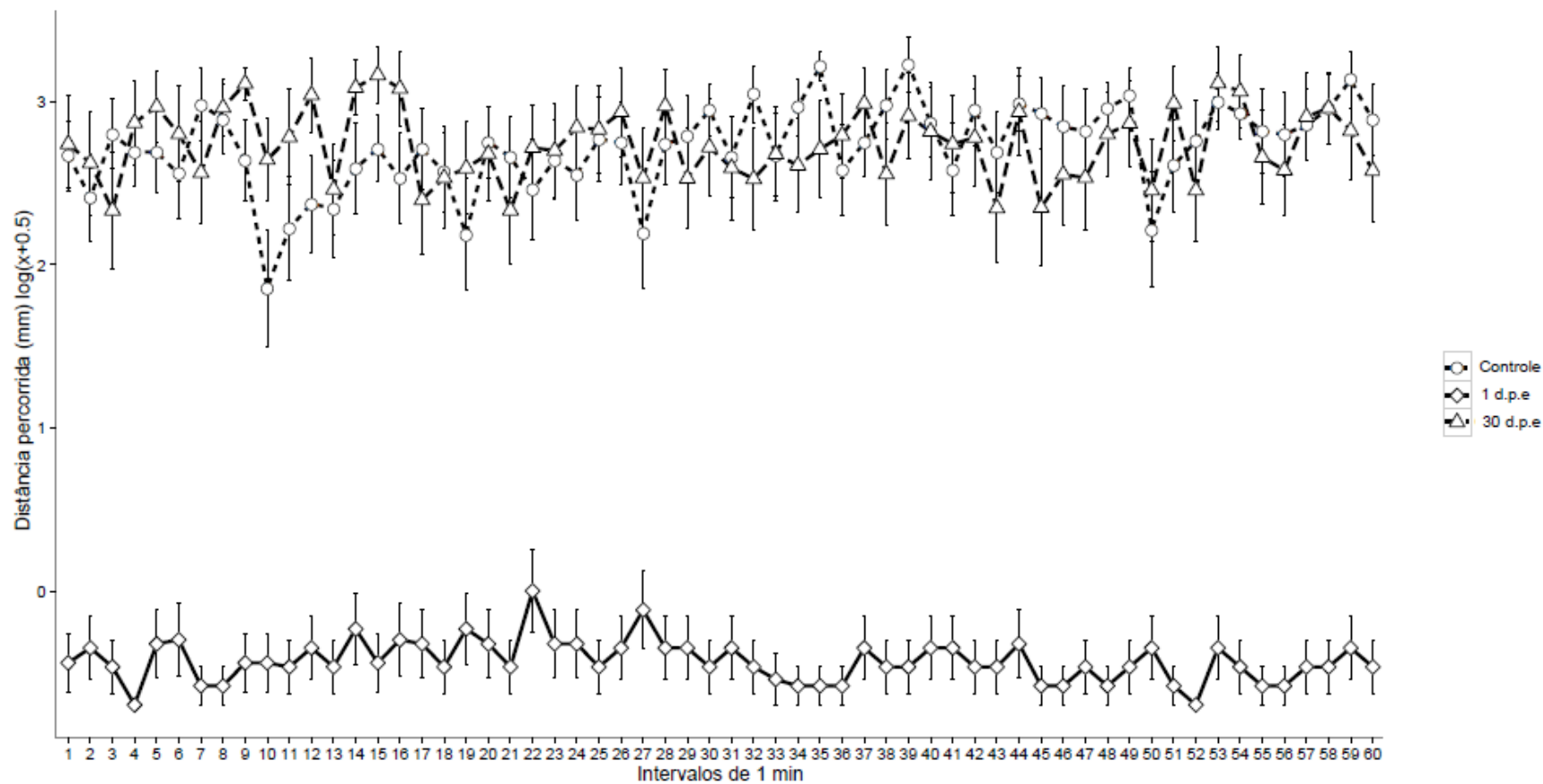


Fig. 1. Comparação entre os gráficos de biomonitoramento de *Biomphalaria glabrata* (Controle, 1 d.p.e. e 30 d.p.e.) exposta ao látex de *Euphorbia milii* (syn. *splendens*) var. *hislopii*, em 60 intervalos de 1 min de monitoramento da Distância percorrida (mm).

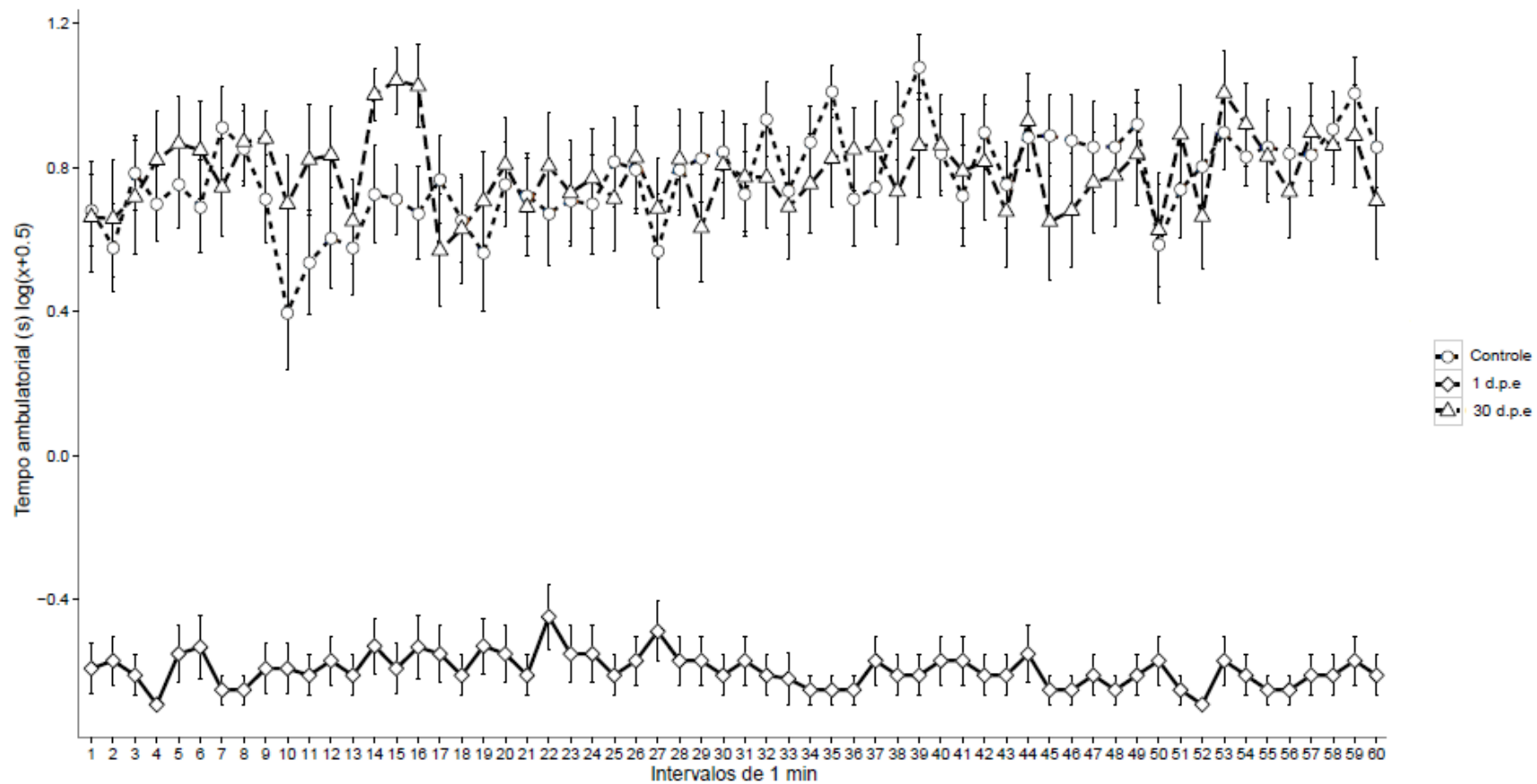


Fig. 2. Comparação entre os gráficos de biomonitoramento de *Biomphalaria glabrata* (Controle, 1 d.p.e. e 30 d.p.e.) exposta ao látex de *Euphorbia milii* (syn. *splendens*) var. *hislopii*, em 60 intervalos de 1 min de monitoramento do Tempo ambulatorial (s).

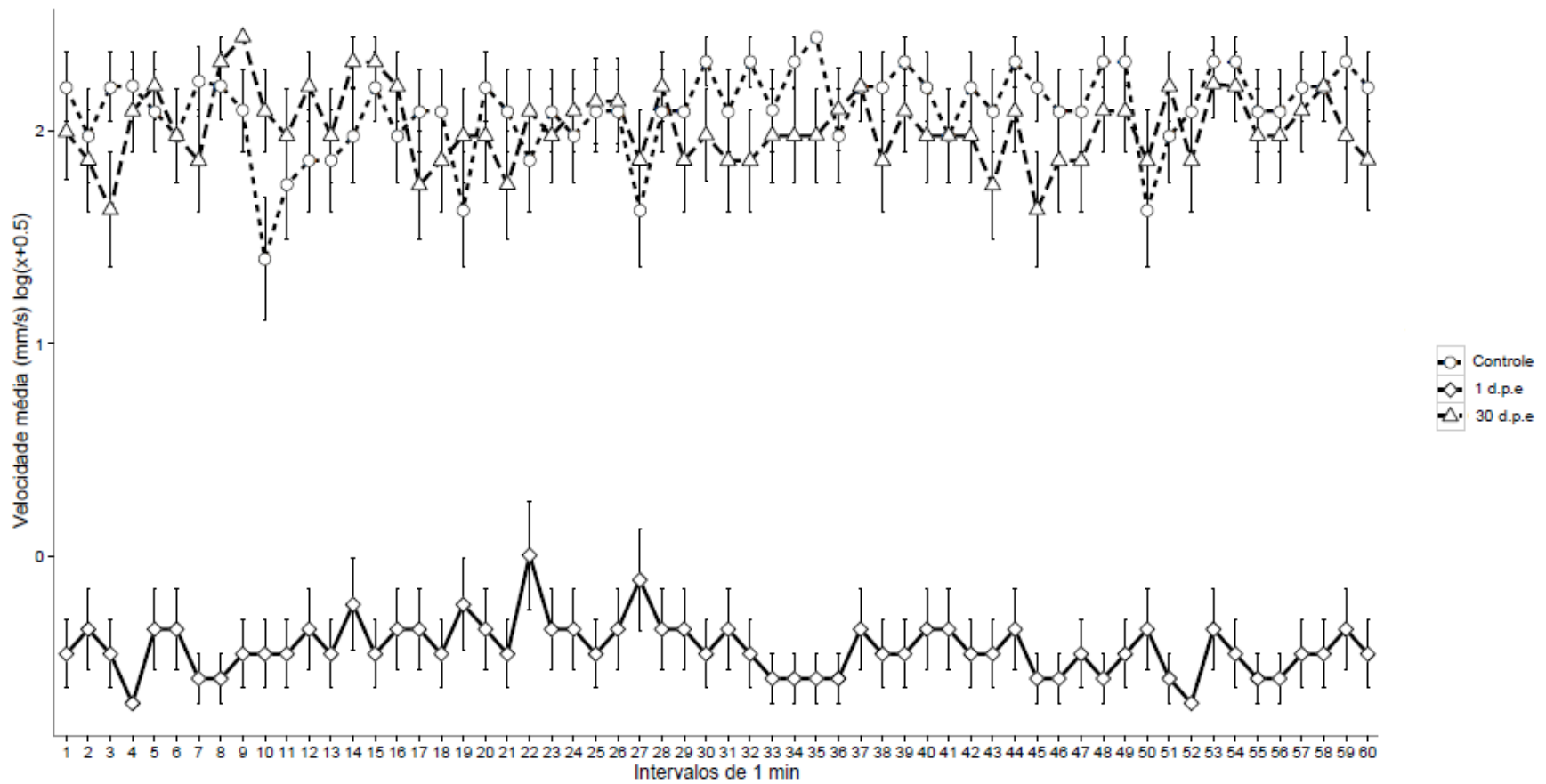


Fig. 3. Comparação entre os gráficos de biomonitoramento de *Biomphalaria glabrata* (Controle, 1 d.p.e. e 30 d.p.e.) exposta ao látex de *Euphorbiamilii* (syn. *splendens*) var. *hislopii*, em 60 intervalos de 1 min de monitoramento da Velocidade média (mm/s).

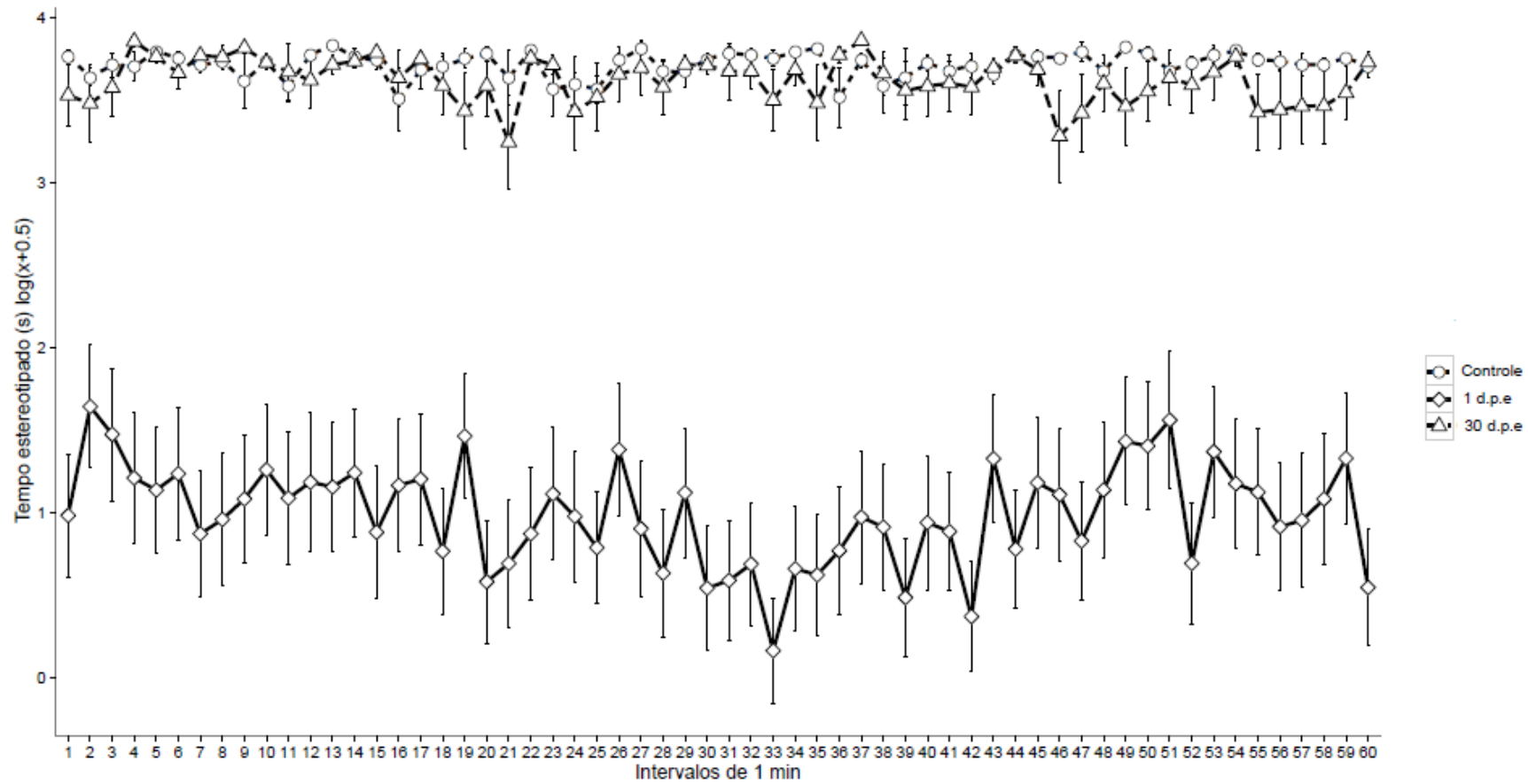


Fig. 4. Comparação entre os gráficos de biomonitoramento de *Biomphalaria glabrata* (Controle, 1 d.p.e. e 30 d.p.e.) exposta ao látex de *Euphorbiamilii* (syn. *splendens*) var. *hislopii*, em 60 intervalos de 1 min de monitoramento do Tempo estereotipado (s).

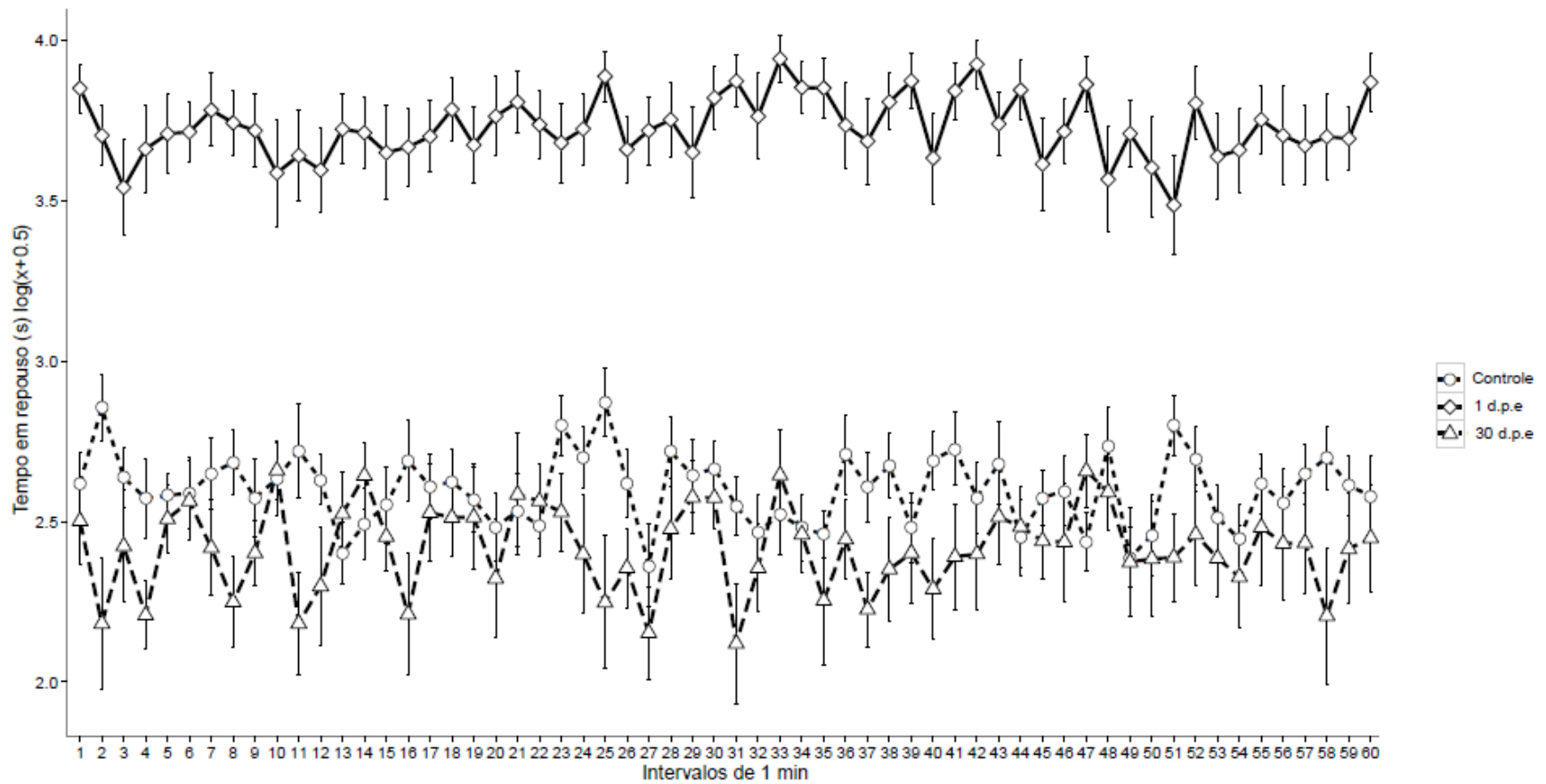


Fig. 5. Comparação entre os gráficos de biomonitoramento de *Biomphalaria glabrata* (Controle, 1 d.p.e. e 30 d.p.e.) exposta ao látex de *Euphorbiamilii* (syn. *splendens*) var. *hislopii*, em 60 intervalos de 1 min de monitoramento do Tempo em repouso (s).

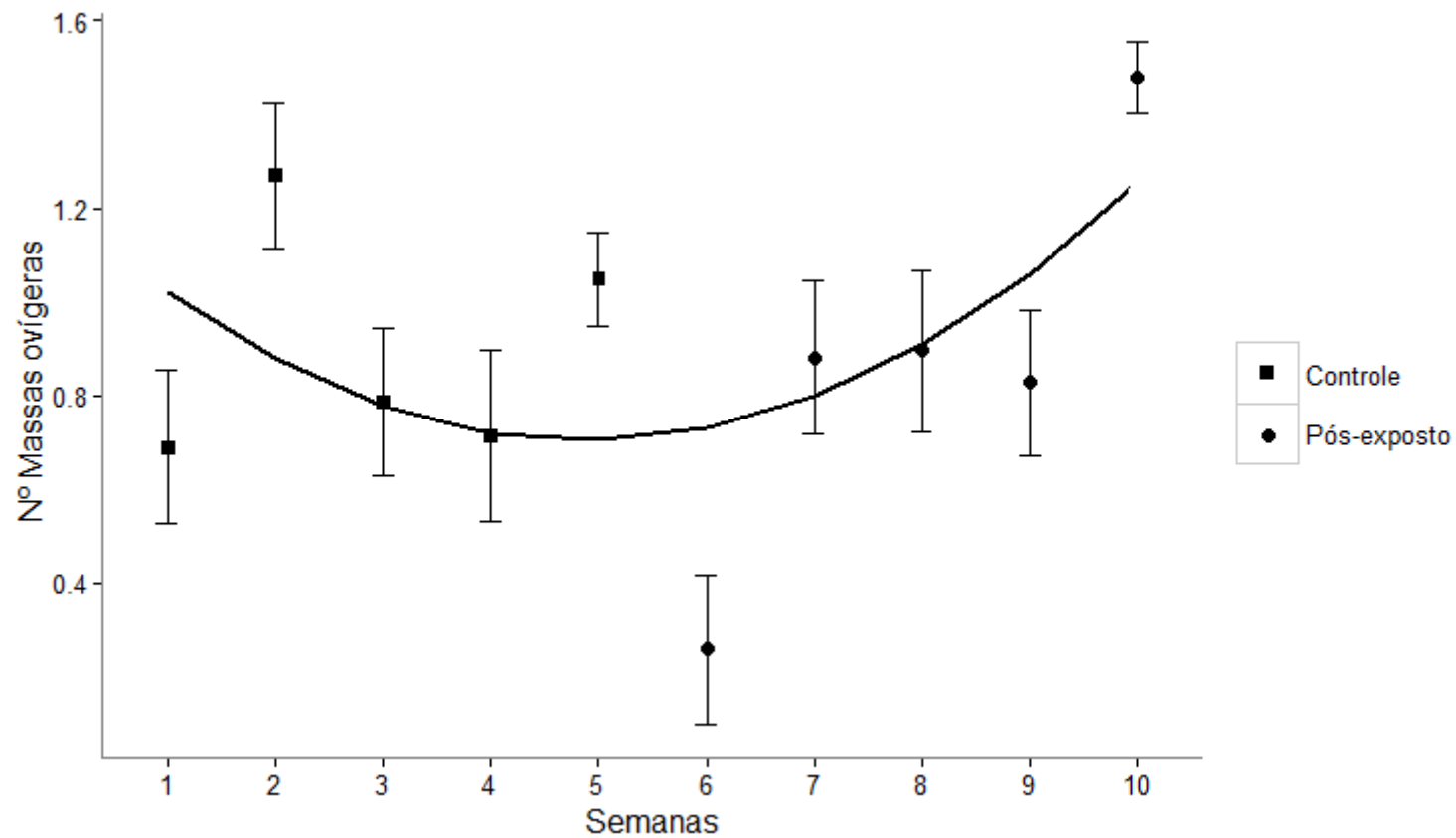


Fig. 6. Semanas de análises dos parâmetros reprodutivos de *Biomphalaria glabrata* exposta ao látex de *Euphorbiamilii* (syn. *splendens*) var. *hislopii*.
 Número de massas ovíferas.

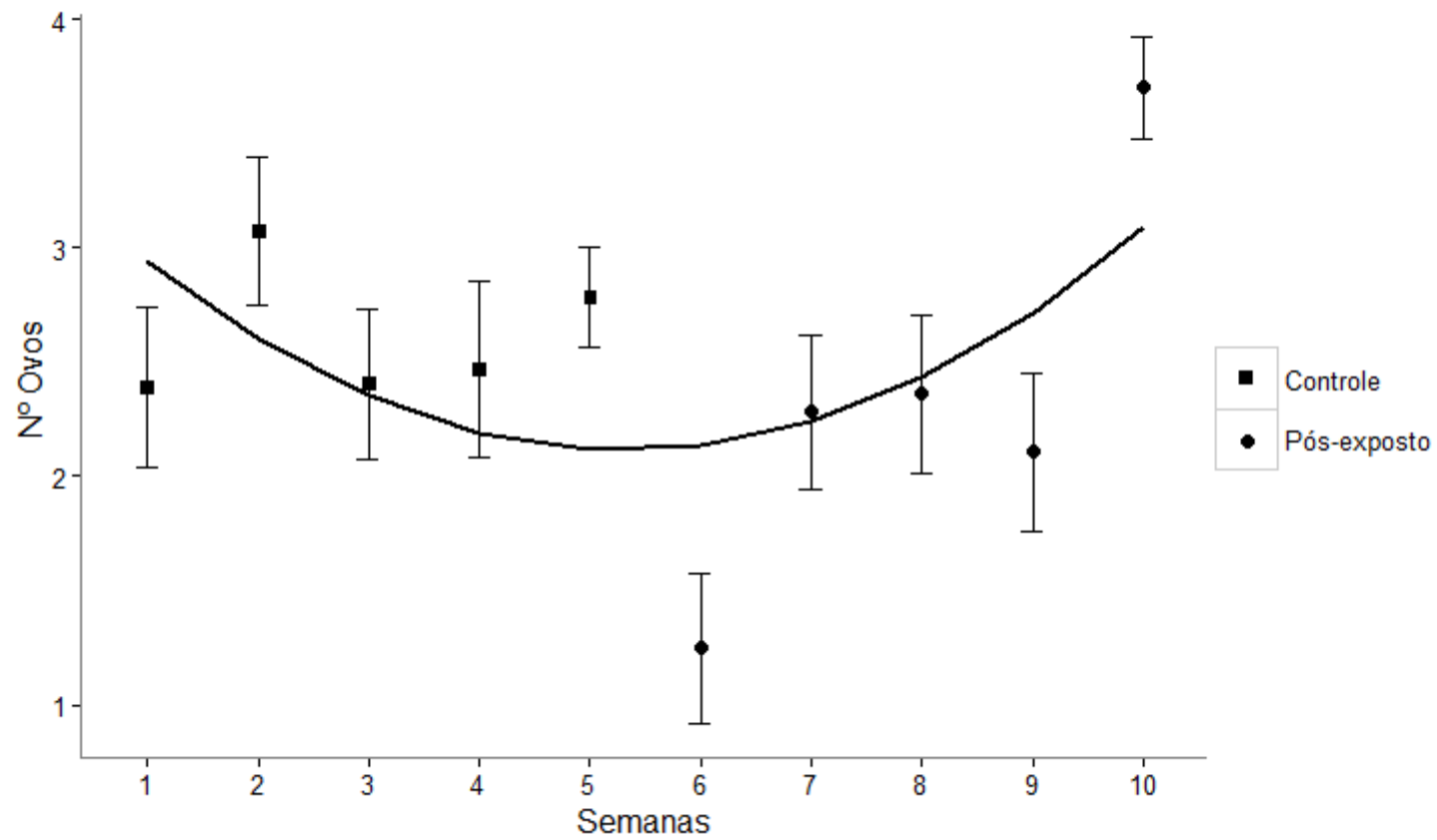


Fig. 7. Semanas de análises dos parâmetros reprodutivos de *Biomphalaria glabrata* exposta ao látex de *Euphorbia milii* (syn. *splendens*) var. *hislopii*. Número de ovos.

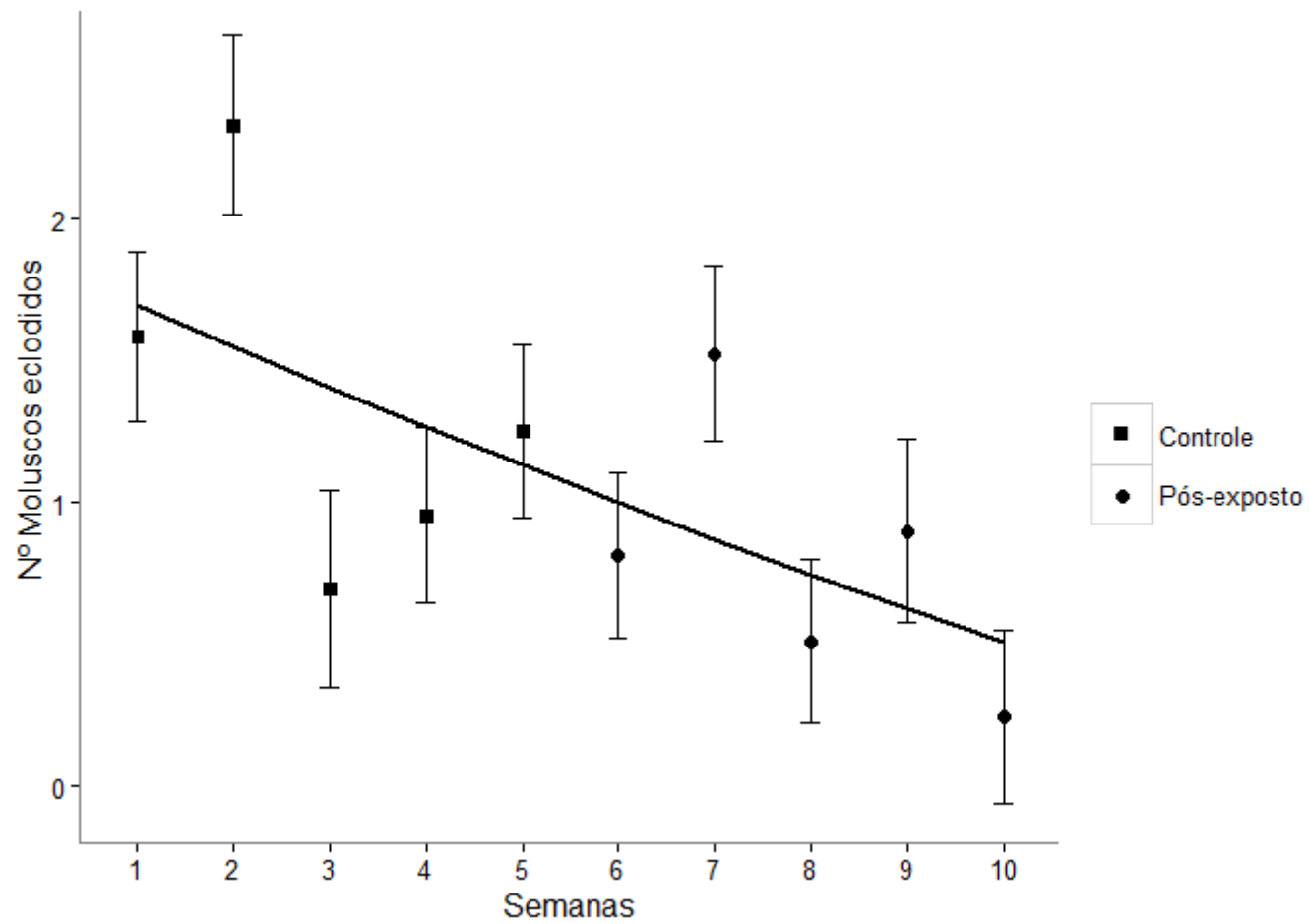


Fig. 8. Semanas de análises dos parâmetros reprodutivos de *Biomphalaria glabrata* exposta ao látex de *Euphorbiamilii* (syn. *splendens*) var. *hislopii*.
 Número de moluscos eclodidos.

Tabela 1-Número de massas ovíferas/caramujo, ovos/caramujo, ovos/desovas e taxa de eclodibilidade por semana dos grupos controle e pós exposição (1d.p.e. e 30d.p.e.).

Controle					Pós exposição				
Semanas	Massas ovíferas/Caramujo	Ovos/Caramujo	Ovos/Massas ovíferas	Taxa de eclosão	Semanas	Massas ovíferas/Caramujo	Ovos/Caramujo	Ovos/Massa ovíferas	Taxa de eclosão
1^a	2,18	26,14	11,99	38	1^a	1,25	8,62	6,89	62
2^a	3,92	42,51	10,84	51	2^a	2,62	27,88	10,64	39
3^a	2,33	24,22	10,39	33	3^a	2,77	27,66	9,98	17
4^a	2,40	31,96	13,31	20	4^a	2,37	22,88	9,65	30
5^a	2,66	24,40	9,17	32	5^a	4	51,20	12,80	2,92
Médias	2,69	29,84	11,14	34	Médias	2,60	27,64	9,99	30,18

3.4- DISCUSSÃO

O biomonitoramento por análise de imagens vem sendo utilizado para determinar padrões locomotores de moluscos e peixes sobre efeito de agentes externos de origem química ou biológica, relevantes para as áreas de toxicologia e parasitologia (SARQUIS et al., 1998; SANTOS & SANTOS, 2013; SANTOS et al., 2013; ALBERTO-SILVA et al., 2015; LOPES, 2016).

A análise do efeito tóxico de um produto moluscicida sobre os parâmetros locomotores de moluscos hospedeiros foi primeiramente descrita por Sarquis et al. (1998). Estes autores verificaram o efeito da exposição de Bayluscide® WP 70 (Niclosamida), em *Biomphalaria straminea*, espécie hospedeira intermediária, responsável pela transmissão da esquistossomose na região nordeste do Brasil. Os autores verificaram os efeitos na atividade locomotora usando apenas dois parâmetros locomotores ('Velocidade média' e 'Tempo ambulatorial'), nas três primeiras horas de ação do produto com intervalos de 15 minutos e observaram uma redução significativa da 'Velocidade média' e 'Tempo ambulatorial' no grupo exposto em comparação com o mesmo período do grupo controle. Nosso estudo fazendo uso da mesma metodologia utilizando CL₅₀ do látex de *E. milii* foi possível também verificar após 1 dia de exposição (grupo 1 d.p.e.) que houve um decréscimo significativo de todos os parâmetros locomotores analisados e um aumento do 'Tempo em repouso'. Sendo assim, tanto o látex quanto a Niclosamida atuam da mesma forma sobre o sistema locomotor dos moluscos hospedeiros, influenciando o seu comportamento.

A resposta comportamental frente ao látex de *E. milii* também foi observada com outras espécies de importância médica e econômica. A espécie invasora *Achatina fulica*, hospedeira do Nematoda *Angiostrongylus costaricensis* causador da angiostrongilíase e *Angiostrongylus cantonensis* que causa meningoencefalite eosinofílica foi avaliada quanto ao comportamento em condições laboratoriais após a exposição ao látex *E. milii* por 96 horas, através de pulverização. Foram observados movimentos de contração da massa cefalopédica, movimentos aleatórios e grande liberação de muco (CRIGNIS et al., 2012). Comportamentos semelhantes foram verificados em nosso estudo com *B. glabra*, onde os moluscos expostos possuíam maior tempo de repouso, devido sua retração dentro da concha e redução dos movimentos ambulatoriais e estereotipados. Muitos produtos colocados nos recursos hídricos não agem somente sobre os moluscos adultos, mas também na sua capacidade de produzir ovos. Schall et al. (1998) observaram a ação direta do látex de *E. milii* sobre massas ovíferas, verificando que o látex apresenta efeito letal sobre os ovos no interior da desova a partir de 870 mg/L, oito vezes mais do que o preconizado pela OMS como concentração letal para moluscos. Mello-Silva et al. (2007) estudaram a ação deste mesmo produto em concentrações subletais (CL₅₀) em *B. glabrata* não infectada e exposta por 24 horas. A exposição do látex causou a interrupção da postura de ovos no primeiro dia e uma redução na primeira semana, tendo recuperado os padrões normais após cinco semanas da reprodução. No entanto a eclodibilidade continuou reduzida em torno de 36% ao longo das cinco semanas de exposição (Mello-Silva et al., 2007). Em nosso trabalho foi possível observar uma redução na produção de ovos de forma temporária em *B. glabrata* não infectada ocasionada pela exposição ao látex de *E. milii* na primeira semana após a exposição. Além disso, verificou-se uma redução da taxa de eclodibilidade ao longo das quatro últimas semanas após a exposição, corroborando com Mello-Silva et al. (2007). Como avaliamos os mesmos moluscos antes e depois da exposição, minimizamos a

questão de padrões de posturas variáveis entre os indivíduos da mesma espécie, tornando os resultados de ação direta do látex na biologia reprodutiva mais próximo da realidade. Assim, a diminuição, irregularidade e formação de ovos não viáveis podem promover um controle populacional dos moluscos, principalmente logo após a aplicação do produto. Este é um fato importante que deve ser levado em consideração no uso deste produto nos recursos hídricos.

As condições ambientais interferem diretamente no potencial reprodutivo de *B. glabrata*. Vários fatores podem alterar a biologia reprodutiva dos moluscos (MAGALHÃES & DE LUCCA, 1971; KAWAZOE, 1977; MINCHELLA & LOVERDE, 1981; MINCHELLA, 1985), entretanto, os moluscos conseguem restabelecer a população, mesmo com presença de apenas um indivíduo, quando as condições tornam-se favoráveis (BARBOSA & BARBOSA, 1994). Em nosso experimento, os moluscos foram mantidos isolados, produzindo ovos por autofecundação, característica incomum, mas importante em estudos que visam o controle dos mesmos, a fim de avaliar a capacidade de repovoamento em condições extremas. Costa et al. (2004) comparando as estratégias reprodutivas de autofecundação e fecundação cruzada em *B. glabrata* e *B. straminea*, observaram que a espécie *B. glabrata* apresentou maior capacidade reprodutiva em fecundação cruzada do que em autofecundação. Comparando a autofecundação nas duas espécies, *B. glabrata* demonstrou menor potencial reprodutivo. Em nosso estudo, *B. glabrata* em autofecundação apresentou em média, maior número de massas ovíferas e ovos, mas menor taxa de eclosão do que a referida por Costa et al. (2004) em todas as observações, com exceção da primeira semana após exposição, onde os valores de massas ovíferas e ovos foram menores e a taxa de eclosão foi maior em 5%.

As consequências da exposição ao látex de *E. miliise* assemelha fisiologicamente ao parasitismo pelo *S. mansoni* em *B. glabrata*. Os dois processos de estresse fisiológico reduzem as reservas energéticas (glicose e galactose) dos moluscos e promovem a interrupção temporária da reprodução (MINCHELLA, 1985; MELLO-SILVA et al., 2007, 2010, 2011; FARO et al., 2013). Quanto às alterações nas reservas energéticas, El-Ansay e Al Daihan, (2006) observaram que uma diminuição metabólica pode comprometer os parâmetros locomotores. Em nosso experimento, observou-se uma redução das atividades locomotoras e reprodutivas dos moluscos após um dia de exposição, sugerindo que ambas as atividades foram reduzidas devido às alterações no metabolismo de carboidratos nos sítios de reserva. Com menos reserva energética, moluscos se movimentariam menos e colocariam menos ovos, principalmente durante a ação do produto, quando o efeito do produto termina, os parâmetros locomotores e reprodutivos tenderam a voltar ao normal.

Comportamentos reprodutivos e locomotores se encontram entre os fatores que interferem na distribuição e na abundância dos moluscos no ambiente límnic. Alterações nesses comportamentos são adaptações do molusco para manter a homeostase frente a um agente estressor. Conclui-se que a CL₅₀ do látex de *E. miliivar.hislopii* altera temporariamente os parâmetros locomotores e reprodutivos de *B. glabrata*, podendo interferir no equilíbrio desta população e nas demais populações ao longo da cadeia trófica. No entanto, o tempo curto dos seus efeitos nos moluscos, reduz o tempo de contaminação do ambiente, restabelecendo mais rapidamente os padrões de normalidade da qualidade da água.

4- CONCLUSÕES GERAIS

Com base nos resultados apresentados nos capítulos, pode-se concluir que:

- 1- A infecção por *S. mansoni* aumenta o comportamento locomotor (distância percorrida, tempo ambulatorial, tempo estereotipado e velocidade média) e diminui os parâmetros reprodutivos (massas ovíferas, ovos/molusco e moluscos eclodidos) de *B. glabrata*;
- 2- O aumento no número de cercárias eliminadas está diretamente associado à redução/interrupção do número de ovos colocados e ao aumento da frequência dos movimentos aleatórios (tempo estereotipado);
- 3- A exposição de *B. glabrata* à CL₅₀ do látex de *E. milii* var. *hislopii* diminui temporariamente os parâmetros locomotores e reprodutivos dos moluscos que voltarão aos padrões normais após 30 dias da exposição.

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABÍLIO, F. J. P.; RUFFO, T. L. M.; SOUZA, A. H. F. F.; JUNIOR, E. T. O.; MEIRELES, B. N.; SANTANA, A. C. D. Macroinvertebrados bentônicos como bioindicadores de qualidade ambiental de corpos aquáticos da caatinga. **Oecologia Brasiliensis**, v. 11, n. 3, p. 409, 2007.

ALBERTO-SILVA, A. C.; SANTOS, E. G. N.; SANTOS, C. P.; MELLO-SILVA, C. C. Changes in the locomotory and reproductive behavior of *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni*. **Experimental Parasitology**, v. 153, p. 68–74, 2015.

AUGUSTO, R. C.; FRIANI, G.; VASCONCELLOS., M. C.; RODRIGUES, M, L. A.; MELLO-SILVA, C. C. *Schistosoma mansoni*: phytochemical effect on aquatic life cycle. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 5, p. 127-132, 2015.

AUGUSTO, R. C.; MELLO-SILVA, C. C.; GATTI, M. J.; MAFRA, C. L.; SANTOS, C. P. First electron probe x-ray microanalysis of the elemental composition of the lyophilized látex of *Euphorbia milii* var. *hislopii* and its impact in the male *Schistosoma mansoni*. **Neotropical Helminthology**, v. 10 n.2, p. 2218-6425, 2016.

BARBOSA, F. S.; BARBOSA, C. S. The bioecology of snail vectors for schistosomiasis in Brazil. **Caderno Saúde Pública**, v. 10, n. 2, p. 200-209, 1994.

BARBOSA F. S. (org). **Tópicos em malacologia médica**. Rio de Janeiro: Fiocruz. p. 314, 1995.

BECKER, W. Metabolic interrelationship of parasitic trematodes and mollusc especially *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v. 63, p. 101-11, 1980.

BECKER, W. Purine metabolism in *Biomphalaria glabrata* under starvation and infection with *Schistosoma mansoni*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 76, p. 215–219, 1983.

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

BICUDO, C. E. M.; BICUDO, D. C. **Amostragem em Limnologia**. Rima, São Carlos-SP, p. 346, 2004.

BODE, R. W.; NOVAK, M. A.; ABELE, L. E.; HEITZMAN, D. L.; SMITH, A. J. Quality assurance work plan for biological stream monitoring in New York State. **Stream biomonitoring unit bureau of water assessment and management division of water NYS department of environmental conservation**, p. 122. 2002.

BOISSIER, J.; RIVEA, E.; MONÉ, H. Altered behaviour of the snail *Biomphalaria glabrata* as a result of infection with *Schistosoma mansoni*. **Journal Parasitology**, v. 89, p. 429–433, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Vigilância e Controle de moluscos de Importância Epidemiológica**: Diretrizes técnicas. 2ª. Ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Vigilância da Esquistossomose mansoni**: Diretrizes técnicas. 4ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Esquistossomose. Situação Epidemiológica - Dados. Brasília, 2016. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/>. Acesso: 05/09/2016.

CARVALHO, O. C.; COELHO, P. M.; LENZI, H. L. *Schistosoma mansoni* Esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1124p, 2008.

CHAPIN III, F. S.; ZAVALA, E. S.; EVINER, V. T.; NAYLOR, R. L.; VITOUSEK, P. M.; REYNOLDS, H. L.; HOOPER, D. U.; LAVOREL, S.; SALA, O. E.; HOBBIES, S. E.; MACK, M. C.; DÍAZ, S. Consequences of changing biodiversity. **Nature**, v. 405, p. 234-242, 2000.

COLLEY, DG; BUSTINDUY, A.L.; SECOR, W.E.; KING, C.H. Human Schistosomiasis. **The Lancet**, v. 383, p. 2253-2264, 2014.

COLLINS III, J. J.; KING, R. S.; COGSWELL, A. C.; WILLIAM, D. L.; NEWMARK, P. A. An Atlas for *Schistosoma mansoni* Organs and Life-Cycle Stages Using Cell Type-Specific Markers and Confocal Microscopy. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 3. 2011.

COSTA, M. J.; GRAULT, C. E.; CONFALONIERI, E. C. Comparative study of the fecundity and fertility of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) and *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) in a laboratory through self-fertilization and cross-fertilization. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, n. 3, p. 157-163, 2004.

CRIGNIS, R. D. N.; TERRA, V. R.; PANI, G.; SANTOS, J. B.; SILVA, A. G.; CRUZ, Z. M. A. Determination of LD₅₀ of the latex of *Euphorbia splendens* var. *hislopii* N.E.B (syn. *Euphorbia milii* Des Moul. var. *splendens* (Ursch & Leandri) against *Achatina fulica* (Bowdich, 1822). **Natureza on line**, v. 10, n. 2, p. 77-80, 2012.

DEJONG, R. J.; MORGAN, J. A.; PARAENSE, W. L.; POINTIER, J. P.; AMARISTA, M.; AYEK-KUMI, P.F.; DE SOUZA, C. P.; Evolutionary relationships and biogeography of *Biomphalaria* (Gastropoda: Planorbidae) with implications regarding its role as host of the human bloodfluke, *Schistosoma mansoni*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 18 n. 12, p. 2225-2239, 2001.

DEJONG, R. J.; MORGAN, J. A. T.; WILSON, W. D.; AL-JASER, M. H.; APPLETON, C. C.; COULIBALY, G.; MAGALHÃES, L. A. Phylogeography of *Biomphalaria glabrata* and *B. pfeifferi*, important intermediate hosts of *Schistosoma mansoni* in the New and Old World tropics. **Molecular Ecology**, v. 12, n. 11, p. 3041-3056, 2003.

DESPOMMIER, D.; GWADZ, R.; HOTEZ, P. J.; KNIRSCH, C. **Parasitic Diseases**. 5th ed. New York: Apple Trees Productions, 2005.

EATON, D. P. Macroinvertebrados aquáticos como indicadores ambientais da qualidade da água. pp. 43-67. In: J. Cullen, R. Rudran & C. Valladares-Padua, (org). **Métodos de estudo em biologia da conservação e manejo da vida silvestre**. Curitiba: Editora UFPR, p. 667, 2003.

EL-ANSARY, A.; AL-DAIHAN, S. Important aspects of *Biomphalaria* snail-schistosome interactions as targets for antischistosome drug. **Medical Science Monitor**, v. 12, p. 282–292, 2006.

FARO, M. J.; PERAZZINI, M.; CORRÊA, L.R.; MELLO-SILVA, C. C.; PINHEIRO, J.; MOTA, E. M.; SOUZA, S.; ANDRADE, Z.; MALDONADO JR, A. Biological, biochemical and histopathological features related to parasitic castration of *Biomphalaria glabrata* infected by *Schistosoma mansoni*. **Experimental Parasitology**, v. 134, p. 228–234, 2013.

FERNANDEZ, M. A.; THIENGO, S. C.; AMARAL, R. S. Técnicas malacológicas. In: BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Vigilância e Controle de moluscos de Importância Epidemiológica: Diretrizes técnicas**. 2^a. Ed. Cap. 4, p. 43-70. Brasília: Ministério da Saúde, 2008.

GALVÃO, L. A.; FINKELMAN, J.; HENAO, S. **Determinantes ambientais e Sociais da Saúde**. Washington: OPAS, 2011.

GIOVANELLI, A.; SILVA, C. L. P. A. C.; MEDEIROS, L.; VASCONCELLOS, M. C. The molluscicidal activity of the latex of *Euphorbia splendens* var. *hislopii* on *Melanoides tuberculata* (Thiaridae), a snail associated with habitats of *Biomphalaria glabrata* (Planorbidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 123-125, 2001.

HELLAWELL, J. M. **Biological indicators of freshwater pollution and environmental management**. New York, 1986.

HOTEZ, P. J.; BOTTAZZI, M. E.; FRANCO-PAREDES, C.; AULT, S. K.; PERIAGO, M. R. The Neglected Tropical Diseases of Latin America and the Caribbean: A Review of Disease Burden and Distribution and a Roadmap for Control and Elimination. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 9, p. 300, 2008.

HOTEZ, P. J.; FENWICK, A.; SAVIOLI, L.; MOLYNEUX, D. H. Rescuing the bottom billion through control of neglected tropical diseases. **Lancet**, v. 373, n. 9674, p. 1570-1575, 2009.

HOTEZ, P. J.; SAVIOLI, L.; FENWICK, A. Neglected Tropical Diseases of the Middle East and North Africa: Review of Their Prevalence, Distribution, and Opportunities for Control. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 2, p. 1475, 2012.

HØJSGAARD, S.; HALEKOH, U.; YAN, J. The R Package geepack for Generalized Estimating Equations. **Journal of Statistical Software**, v. 15, n. 2, p. 1-11, 2006.

IBGE. Censo Demográfico 2010. Agregado por Setores censitários dos resultados do universo. Rio de Janeiro: IBGE, 2010. Disponível em: www.ibge.gov.br/censo2010. Acesso: 08/08/16.

JANNOTTI-PASSOS, L. K.; CALDEIRA, R. L.; CARVALHO, O. S. Técnicas utilizadas no estudo dos moluscos do gênero *Biomphalaria* e na manutenção do ciclo de *Schistosoma mansoni*. In: CARVALHO, O. C.; COELHO, P. M.; LENZI, H. L. *Schistosoma mansoni* Esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, cap. 17, p. 529-547, 2008.

JURBERG, P., SCHALL, V. T., BARBOSA, J. V., GATTI, M. J., SOARES, M. S. Behavior of *Biomphalaria glabrata*, the intermediate host snail of *Schistosoma mansoni*, at different depths in water in laboratory conditions. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, p. 197–208, 1987.

JURBERG, P., SOARES, M. S., MASCITELLI, A. C., FAVRE, T. C., BARBOSA, J. V. Studies on survival, biological activities and behavior of *Biomphalaria glabrata*, the host snail of schistosomiasis, submitted to increased hydrostatic pressure: a technique. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 83, p. 53–61, 1988.

JURBERG, P.; CUNHA, R. A.; BARBOSA, J. V.; SOARES, M. S.; SCHALL, V. T.; GATTI, M. J. Catálogo Comportamental de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Gastropoda; Planorbidae), Caramujo Vetor da Esquistossomose. In: BARBOSA, F. S., org. **Tópicos em malacologia médica**. Rio de Janeiro: Fiocruz, v. 314, 1995.

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

LAMBERTUCCI, J. R. Acute schistosomiasis mansoni: revisited and reconsidered. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 4, p. 422-435, 2010.

LENZI, H. L.; JURBERG, A. D., COELHO, P. M. Z.; LENZI, J. A. P. Migração e desenvolvimento de *Schistosoma mansoni* no hospedeiro definitivo. In: CARVALHO, O. C.; COELHO, P. M.; LENZI, H. L. *Schistosoma mansoni* e Esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, cap. 3, p. 85-147, 2008a.

LENZI, H.L.; ROMANHA, V.S.; MACHADO, M.P.; MOTTA, E.M.; LENZI, J.A. Patologia experimental com enfoque no granuloma esquistossomótico. In: CARVALHO, O. C.; COELHO, P. M.; LENZI, H. L. **Schistosoma mansoni e Esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, cap. 19, p. 569-655, 2008b.

LIMA, M. A.; CABRAL, O. M. R.; MIGUEZ, J. D. G. **Mudanças climáticas globais e a agropecuária brasileira**. Jaguariuna: Embrapa Meio Ambiente, 2001.

LIMA, M. G.; AUGUSTO, R. D.; VASCONCELLOS, M. C.; MELLO-SILVA, C. C.; PINHEIRO, J. Metabolic changes in *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni* exposed to latex of *Euphorbia milii* solution versus times of preparation. **Journal of natural products**, v. 5, p. 222-232, 2012.

LOPES, K. C. **Efeito subletal da cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska, 1912) na atividade locomotora de *Poecilia vivipara* Bloch e Schneider, 1801 (Poeciliidae)**. Dissertação. Mestrado em Biodiversidade e Saúde- Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2016.

MACHADO-SILVA, J. R. M.; NEVES, R. H.; GOMES, D. C. In: CARVALHO, O. C.; COELHO, P. M.; LENZI, H. L. Filogenia, co-evolução, aspectos morfológicos e biológicos das diferentes fases de desenvolvimento de *Schistosoma mansoni*. **Schistosoma mansoni e Esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, cap.2, p. 43-85, 2008.

MAGALHÃES, L. A.; DE LUCCA, O. Determinação do período de desenvolvimento e da viabilidade das desovas de duas populações de *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria tenagophila* (Mollusca, planorbidae). **Revista da Sociedade de Medicina Tropical**, v. 5, n. 6, p. 307-313, 1971.

MAGALHÃES, D. P., CUNHA, R. A., BUSS, D. F., SANTOS, J. A. A., BAPTISTA, D. F. Behavioral response of the zebrafish *Danio rerio* to sublethal stress by sodium hypochlorite– evaluation of a method of toxicological essay by real-time biomonitoring in the laboratory. **Ecotoxicology**, v. 16, p. 417–422, 2007.

MALDONADO JUNIOR, A.; GENTILE, R.; FERNANDES, C. M.; D'ANDREA, P. S.; LANFREDI, R. M.; REY, L. Helminth communities of *Nectomys squamipes* (Rodentia: Sigmodontinae) naturally infected by the exotic trematode *Schistosoma mansoni* in south eastern Brazil. **Journal of Helminthology**, v. 80, p. 369-375, 2006.

MARSTON, A. & HECKER, E. On the active principles of the Euphorbiaceae. VI. **Planta Medicinal**. v.47. p. 141-147, 1983.

MARSTON, A.; HERCKER, E. Actives principles of Euphorbiaceae VI. **Planta Medica**, v. 47, p. 141-47, 1984.

MELLO-SILVA, C. C.; VASCONCELLOS, M. C.; PINHEIRO, J.; RODRIGUES, M. L. A Physiological changes in *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (Pulmonata:

Planorbidae) caused by sub-lethal concentrations of the látex of *Euphorbia splendens* var. *hislopii* N. E. B (Euphorbiaceae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 10, n. 1, p. 3-8, 2006.

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

MELLO-SILVA, C. C., VILAR, M. M., VASCONCELLOS, M. C., PINHEIRO, J., RODRIGUES, M. L. A., Carbohydrate metabolism alterations on the *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni* and exposed to *Euphorbia splendens* var. *hislopii* latex. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, p. 492–495, 2010.

MELLO-SILVA, C. C.; VASCONCELLOS, M. C.; BEZERRA, J. C. B.; RODRIGUES, M. L. A.; PINHEIRO, J. The influence of exposure to *Euphorbia splendens* var. *hislopii* latex on the concentrations of total proteins and nitrogen products in *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni*. **Acta Tropica**, v. 117, p. 101-104, 2011.

MINCHELLA, D. J.; LOVERDE, P. T. A cost of increased early reproductive effort in the snail *Biomphalaria glabrata*. **The American Naturalist**, v. 118, p. 876-881, 1981.

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

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Instrução Normativa** nº 109–3 de Agosto, Artigo 4 parágrafo 1º, 2006.

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

MOORE, J. **Parasites and Behavior of Animals**. Oxford Series in Ecology and Evolution. Oxford University Press, UK, p. 315, 2002.

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

ODUM, E. P.; BARRET, G. W. **Fundamentos de Ecologia**. São Paulo: Thomson Learning, 2007.

OLIVEIRA, C. S. **Alterações nos depósitos de glicogênio e conteúdo de glicose na hemolinfa de *Achatina fulica bowdich*, 1822 (mollusca, gastropoda), hospedeiro intermediário de *Angiostrongylus*, exposta ao látex de coroa de cristo *Euphorbia splendens* var. *hislopii***. Dissertação. Mestrado em Ciências Veterinária. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007.

OLIVEIRA-FILHO, E. C.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Photodegradation of the molluscicidal latex of “crown-of-thorns” (*Euphorbia milii* var *hislopii*). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 5, p. 657-659, 1997.

OLIVEIRA-FILHO, E. C.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Toxicity of *Euphorbia milii* latex and niclosamide to snails and nontarget aquatic species. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.46, p. 342-350, 2000.

PAN, W. Akaike’s information criterion in generalized estimating equations. **Biometrics**, v. 57, p. 120–125, 2001.

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

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

PARAENSE, W. L. Histórico do Gênero *Biomphalaria*, Morfologia e Sistemática Morfológica. In: CARVALHO, O. C.; COELHO, P. M.; LENZI, H. L. **Schistosoma mansoni** Esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, cap. 8, p. 284-309, 2008.

PATZ, J.; CHRISTENSON, M. A mudança climática e a saúde. In: GALVÃO, L. A.; FINKELMAN, J.; HENAO, S. **Determinantes ambientais e sociais da saúde**. Rio de Janeiro: Fiocruz, cap 10, p. 215-232, 2011.

PETERSON, A. E.; VEGOSEN, L.; LEIBLER, J.; DAVIS, M.; FEINGOLD, B.; SILBERGELD, E. As doenças infecciosas emergentes e ao ambiente. In: GALVÃO, L. A.; FINKELMAN, J.; HENAO, S. **Determinantes ambientais e sociais da saúde**. Rio de Janeiro: Fiocruz, cap 12, p. 259-278, 2011.

PIERI, O. S.; JURBERG, P.; RAYMUNDO, J. S. Estudos sobre o comportamento dos planorbídeos: I- Uma técnica de observação e registro comportamental por cinematografia. **Memórias do Instituto OswaldoCruz**, v. 75, p. 57-63, 1980.

PIERI, O. S., JURBERG, P. Comportamento de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) como critério de toxicidade em ensaios biológicos com moluscidas. **Memórias do Instituto OswaldoCruz**, v. 76, n.2, p. 147-160, 1981.

PINHEIRO, J. Alterações fisiológicas nas interações entre larvas de trematódeos e seu primeiro hospedeiro intermediário-moluscos. In: SANTOS, S. B.; PIMENTA, A. D.; THIENGO, S. C.; F, M. A.; A, R. S. **Tópicos em malacologia**. Ecos dos XVIII Encontro Brasileiro de Malacologia. Editora Sociedade Brasileira de Malacologia, v. 18, p. 365, 2007.

POULIN, R., THOMAS, F. Epigenetic effects of infection on the phenotype of host offspring: parasites reaching across host generations. **Oikos**, v. 117, p. 331–335, 2008.

POULIN, R. Parasite manipulation of host behavior: an update and frequently asked questions. **Advances in the Study Behavior**. v. 41, p. 151–186, 2010.

POULIN, R. Parasite manipulation of host personality and behavioural syndromes. **J. Experimental Biology**, v. 216, p. 18–26, 2013.

QUEIROZ, J. F.; SILVA, M. S. G. M.; TRIVINHO-STRIXINO, S. **Organismos bentônicos: biomonitoramento de qualidade de água**. Jaguariúna: Embrapa meio ambiente. Comunicado técnico, 2008.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. A Language and Environment for Statistical Computing. **R Foundation for Statistical Computing**. ISBN 3-900051-07-0, <<http://www.R-project.org/>>.2014.

REY, L. **Parasitologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 4º ed. 2008.

SANTOS, E. G. N.; CUNHA, R. A.; SANTOS, C. P. Behavioral responses of *Poecilia vivipara* (Osteichthyies: Cyprinodontiformes) to experimental infections of *Acanthocollariotrema umbilicatum* (Digenea: Cryptogonimidae). **Experimental Parasitology**, v. 127, p. 522–526, 2011.

SANTOS, E. G. N.; SANTOS, C. P. Parasite-induced and parasite development-dependent alteration of the swimming behavior of fish hosts. **Acta Tropica**. v. 127, p. 56–62, 2013.

SANTOS, E. G. N.; COSTA, V. S.; SANTOS, C. P. Does the trematode *Centrocestus formosanus* affect the locomotory activity of the mollusk *Melanooides tuberculatus*? **Parasite & Vectors**, v. 6, p. 92, 2013.

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.

SARQUIS, O.; PIERI, O.; CUNHA, R.A.; JURBERG, P. Effect of bayluscide WP 70 on the kinetic behavior of *Biomphalaria straminea* in the laboratory conditions. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, p. 239–241, 1998.

SCHALL, V.T.; VASCONCELLOS, M.C.; VALENT, G.U.; SATO, M.I.Z.; FURLAN, E.V.; SANCHEZ, P.S. Evaluation of the genotoxic activity and acute toxicity of *Euphorbia splendens* latex, a molluscicide for the control of Schistosomiasis. **Brazilian Journal Medicine Biology Research**, v.24, p. 573-582, 1991.

SCHALL, V. T.; VASCONCELLOS, M. C.; VILLAÇA-COELHO, A. L.; FERREIRA-LOPES, F. E.; SILVA, I. P. Evaluation of temporal, seasonal and geographic stability of the molluscicidal property of *Euphorbia splendens* latex. **Revista da Instituto Medicina Tropical**, v. 34, n. 3, p. 183-191, 1992.

SCHALL, V. T.; VASCONCELLOS, M. C.; DE SOUZA, C. P.; BAPTISTA, D. F. The molluscicidal activity of Crown of Christ (*Euphorbia splendens* var. *hislopii*) latex on snails acting as intermediate hosts of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 58, p. 7-10, 1998.

SCHALL, V. T.; MASSARA, C.; ENK, M. J.; BARROS, H.S.; MIRANDA, E.S. **Os caminhos da Esquistossomose dentro do nosso corpo**. Série Esquistossomose. Número 8. Parte I. Belo Horizonte: CPqRR- Fiocruz, 44 p., 2007.

SCHOLTE, R. G.; GOSONI, L.; MALONE, J. B.; CHAMMARTIN, F.; UTZINGER, J.; VOUNATSU, P. Predictive risk mapping of schistosomiasis in Brazil using Bayesian geostatistical models. **Acta Tropica**, v. 132, p. 57-63, 2014.

SIMOONGA, C.; UTZINGER, J.; BROOKER, S.; VOUNATSOU, P.; APPLETON, C. C.; STENSGAARD, A. S.; OLSEN, A.; KRISTENSEN, T. K. Remote sensing, geographical information system and spatial analysis for schistosomiasis epidemiology and ecology in Africa. **Parasitology**, v. 136, n. 13, p. 1683-1693, 2009.

SIRE, C., DURAND, P., POINTIER, J. P., THÉRON, A. Genetic diversity and recruitment pattern *Schistosoma mansoni* in a *Biomphalaria glabrata* snail population: a field study using random-amplified polymorphic DNA markers. **Jornal Parasitology**, v. 83, p. 436-441, 1999.

SOUZA, C. P.; LIMA, L. C. **Moluscos de interesse parasitológico no Brasil**. Belo Horizonte: Centro de Pesquisa René Rachou, Fiocruz, 76 p, 1990.

SOUZA, M. A.; BARBOSA, V. S.; WANDERLEI, T. N. G.; BARBOSA, C. S. Criadouros de *Biomphalaria*, temporários e permanentes, em Jaboatão dos Guararapes, PE. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 3, p. 252-256, 2008.

TOLEDO, R.; FRIED, B. ***Biomphalaria* snail and larval trematodes**. Valencia: Springer, p. 255, 2011.

THIENGO, S.; SANTOS, S.; FERNANDEZ, M. Malacofauna límnic da área de influência do lago da usina hidrelétrica de Serra da Mesa, Goiás, Brasil: Estudo qualitativo. **Revista Brasileira Zoologia**, v. 22, n. 4, p. 867-874, 2005.

VASCONCELLOS, M.C.; SCHALL, V.T. Latex of "Coração de Cristo" (*Euphorbia splendens*): an effective molluscicide. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81. p. 475-476, 1986.

VASCONCELLOS, M. C.; AMORIM, A. Molluscicidal action of the latex of *Euphorbia splendens* var. *hislopii* N.E.B ("Christ's Crown") (Euphorbiaceae) against *Lymnaea columella* (Say, 1817) (Pulmonata:Lymnaeidae), intermediate host of

Fasciola hepatica Linnaeus, 1758 (Trematoda: Fasciolidae). 1- Test in Laboratory. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**,v.98, p. 557-563, 2003.

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

WALKER, A. J. Insights into the functional biology of Schistosomes. **Parasites & Vectors**, v.4, n. 203. p. 2-6, 2011.

WICKHAM, H. **ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis**. Springer-Verlag New York, 2009.

WHO.**Report of the who strategic and technical advisory group for neglected tropical diseases**.Salle B, WHO headquarters, Geneva: Switzerland, 2014.