

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

INSTITUTO DE VETERINÁRIA

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

DISSERTAÇÃO

**Avaliação da Influência do Látex Aquoso de *Euphorbia milii*
var. *hislopii* (EUPHORBIACEAE) sobre o Ciclo Biológico de
Schistosoma mansoni (TREMATODA,
SCHISTOSOMATIDAE) em Condições Laboratoriais**

RONALDO DE CARVALHO AUGUSTO

2012



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

Avaliação da Influência do Látex Aquoso de *Euphorbia milii* var. *hislopii* (EUPHORBIACEAE) sobre o Ciclo Biológico de *Schistosoma mansoni* (TREMATODA, SCHISTOSOMATIDAE) em Condições Laboratoriais

RONALDO DE CARVALHO AUGUSTO

Sob a Orientação da Professora Dra.

Maria de Lurdes de Azevedo Rodrigues

Dept. Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio do Janeiro - UFRRJ

e Co-orientação da Dra.

Clélia Christina Corrêa de Mello Silva

Lab. de Esquistossomose Experimental. Instituto Oswaldo Cruz - IOC /Fiocruz

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

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2012

636.0896963

Augusto, Ronaldo de Carvalho, 1986-

A923a

T

Avaliação da influência do látex aquoso de *Euphorbia milii* var. *hislopii* (Euphorbiaceae) sobre o ciclo biológico de *Schistosoma mansoni* (Trematoda, Schistosomatidae) em condições laboratoriais / Ronaldo de Carvalho Augusto - 2012.

114 f.: il.

Orientador: Maria de Lurdes de Azevedo Rodrigues.

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

Bibliografia: f. 85-92.

1. Esquistossomose - Teses. 2. Esquistossomose - Controle - Teses. 3. *Schistosoma mansoni* - Teses. I. Rodrigues, Maria de Lurdes de Azevedo, 1955-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

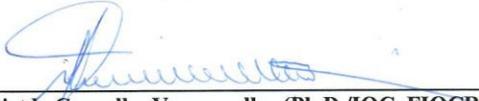
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA ANIMAL
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

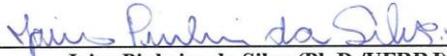
RONALDO DE CARVALHO AUGUSTO

Dissertação submetida ao Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Parasitologia Veterinária, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

DISSERTAÇÃO (TESE) APROVADA EM ----/----/---- (Data da defesa)


Maria de Lurdes de Azevedo Rodrigues (Ph.D./UFRRJ)
(Orientadora)


Maurício de Carvalho Vasconcelos (Ph.D./IOC, FIOCRUZ)


Jairo Pinheiro da Silva (Ph.D./UFRRJ)

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus.

Muito, nos aproxima.”

Louis Pasteur

AGRADECIMENTOS

“*Agradecimentos deveriam não ter fim*”, é com essa singela frase, elaborada por meu irmão Leonardo, que iniciei os agradecimentos na monografia, e é assim que desejo começar novamente na dissertação. Durante os dois intensos anos de mestrado, sou grato a muitas pessoas. Gostaria de agradecer, em primeiro lugar, à Deus por minha vida e pela oportunidade de estar onde estou.

À minha mãe Moema José de Carvalho Augusto, sou muito grato ao amor incondicional, à educação que me destes e ao incansável incentivo para que eu me mantenha na área acadêmica. Sua experiência em fazer ciência aplicada seja no IBGE, seja na ONU sempre foram um grande estímulo e motivo de grande orgulho. Espero representar aos meus, o que você e o papai representam para mim.

À meu pai Ronaldo da Costa Augusto, homem de imenso caráter e responsabilidades. Agradeço pelo amor e a todo esforço feito para que eu pudesse percorrer o caminho que sempre sonhei. Contigo, aprendi que família é a coisa mais importante do mundo!

À meus irmão Pedro C. Augusto, Leonardo C. Augusto, sem vocês as coisas teriam sido bem mais sem graça. Agradeço pela paciência comigo e pela ajuda durante nesses últimos dois anos. Se Deus quiser vocês ainda terão que corrigir muitos textos meus.

À minha avó Maria e tia Berenice, pelo carinho e estímulo, é sempre muito bom estar ao lado de vocês. Agradeço ao apoio financeiro e/ou emocional aos estudos durante o ensino médio e universitário. Amo vocês!

Aos amigos ruralinos Tiago, Eduardo, Carol, Karina, Murilo e muitos outros, pelas incontáveis horas que passamos juntos conversando ou debatendo os mais variados assuntos.

À Prof. Dra. Maria de Lurdes de Azevedo Rodrigues e sua equipe do Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pelo apoio e ensinamentos durante esses anos.

Quero dedicar essa dissertação também àquela que, como orientadora (ou co-orientadora), amiga e professora, me deu liberdade para que eu pudesse, ao longo desses quase 4 anos de parceria, desenvolver os mais diferentes trabalhos. Dedico a você, Doutora Clélia Christina Correa de Mello Silva (LEE, IOC, FIOCRUZ, RJ) minha “MÃE” científica, esta dissertação.

Gostaria de agradecer enormemente a minha grande amiga Mariana Gomes Lima (M.Sc.), pois a inspiração para a construção desta dissertação se deu durante as várias horas em que passamos realizando a etapa experimental de sua dissertação. Agradeço pelos conselhos e pelo exemplo de dedicação a pesquisa.

Ao Dr Maurício de C. Vasconcellos e Dra. Cláudia Portes e toda sua equipe do Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental (IOC, FIOCRUZ, RJ) e à Dra Ester Motta e a equipe do Laboratório de Patologia (IOC, FIOCRUZ, RJ), pela parceria e disponibilidade durante esses dois anos. Sou muito grato pela maneira como fui recebido em seus laboratórios.

Aos amigos Eliane Ruiz, Gabriela Trevisano, M.Sc. Tatiana dos Santos, Dra. Patricia Machado Pinto, Ana Maria, Haroldo, João e Paula do Laboratório de

Esquistossomose Experimental - foi um grande prazer desenvolver, etapa tão especial de minha vida ao lado de vocês.

As centenas de animais fundamentais para a realização desse estudo.

Por fim, mas não por último, quero homenagear e agradecer o apoio que sempre tive à Julia Valentim Tavares, companheira fiel e dedicada, que mesmo reclamando, compreende que além dela, são parte da minha felicidade as atividades acadêmicas que desenvolvo. Te amo minha menina.

BIOGRAFIA

RONALDO DE CARVALHO AUGUSTO, filho de Ronaldo da Costa Augusto e Moema José de Carvalho Augusto, nascido em 30 de junho de 1986, na cidade do Rio de Janeiro. Concluiu o Nível Fundamental no Colégio Nossa Senhora da Misericórdia (CNSM) em 2001 e o Nível Médio no Colégio Palas em 2005.

Ingressou no curso de Ciências Biológicas no primeiro semestre de 2006, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), e desenvolveu estágio com o prof. Dr. Ronald Freire, no Laboratório de Imunologia Aplicada, entre o período de julho de 2006 a março de 2007. Posteriormente, realizou estágio na Estação de Biologia Marinha da UFRRJ, sob orientação da profa. Dra Lídia Miyako Yoshii Oshiro, entre dezembro de 2006 a junho de 2008 e no Laboratório de Esquistossomose Experimental, sob orientação da Dra. Clélia Christina Correa de Mello Silva, de agosto de 2008 a fevereiro de 2010, sendo bolsista de estágio curricular CIEE-FIOCRUZ, durante todo o período.

Concluiu a graduação nas modalidades Licenciatura e Bacharelado e ingressou no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, em março de 2010, sob orientação da prof. Dra. Maria de Lurdes de Azevedo Rodrigues e co-orientação da Dra. Clélia Christina Correa de Mello Silva. Durante o período acadêmico registraram-se apresentações e publicações em reuniões científicas nacionais e internacionais, além de artigos científicos em periódicos indexados. Durante os quatro anos de carreira científica foram realizadas palestras em cursos de Pós-Graduação *lato sensu* do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), FIOCRUZ, mini-curso de curta duração no I Simpósio de Parasitologia da Faculdade de Formação de Professores, FFP/UERJ e relatórios de impactos ambientais (RIMA) com malacofauna.

RESUMO

AUGUSTO, Ronaldo de Carvalho. **Avaliação da Influência do Látex Aquoso de *Euphorbia milii* var. *hislopii* (EUPHORBIACEAE) sobre o Ciclo Biológico de *Schistosoma mansoni* (TREMATODA, SCHISTOSOMATIDAE) em Condições Laboratoriais.** 2011. 97p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Animal). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

A esquistossomose está entre as doenças parasitárias mais prevalentes do mundo. Diante da problemática do controle da infecção esquistossomótica, a Organização Mundial de Saúde (OMS) tem estimulado o desenvolvimento de estratégias que objetivam a redução/eliminação do ciclo de *Schistosoma mansoni* em áreas endêmicas. O extrato aquoso do látex de *Euphorbia milii* (syn. *splendens*) var. *hislopii* apresenta relevantes características como produto seletivo no controle da endemia em larga escala. A presença das formas evolutivas no ambiente (ovos, miracídios e cercárias) e os períodos pré-patente e patente no hospedeiro intermediário, são fases críticas do desenvolvimento do ciclo, dado que nesses períodos tais formas encontram-se mais susceptíveis a ação de produtos veiculados no recurso hídrico. A presente dissertação apresentará o formato de artigo e será dividida em três capítulos, sendo eles: 1- Efeito do moluscicida *E. milii* var. *hislopii* no desenvolvimento de *S. mansoni* em *Biomphalaria glabrata*, 2- Controle da dinâmica parasitária de *S. mansoni* em *B. glabrata* através do tratamento de ovos e miracídios com *E. milii* var. *hislopii* e, 3- Influência do látex de *E. milii* var. *hislopii* na formação de *S. mansoni* no hospedeiro definitivo. Com base nos resultados obtidos, podemos concluir que a propriedade moluscicida e esquistossomicida do produto em questão, viabilizada pela ação do mesmo nas formas infectantes e nos hospedeiros intermediários promove de forma concomitante e eficiente o controle da transmissão e da morbidade da doença. Um único produto, natural, biodegradável, em baixas doses, viável ecologicamente altera o desenvolvimento do ciclo do parasito nos hospedeiros intermediários e definitivos, gerando a redução de formas infectantes e a preservação das populações de moluscos em seu habitat natural.

PALAVRAS-CHAVE: *Controle da esquistossomose, moluscicida, esquistossomicida*

ABSTRACT

AUGUSTO, Ronaldo de Carvalho. **Evaluation of the Influence of Aqueous Latex of *Euphorbia milii* var. *hislopii* (EUPHORBIACEAE) on the Biological Cycle of *Schistosoma mansoni* (TREMATODA, SCHISTOSOMATIDAE) Under Laboratory conditions.** 2012. 97p. Dissertation (Master Science in Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

Schistosomiasis is one the most prevalent parasitic diseases in the world. With the problem of schistosomiasis infection control, the World Health Organization (WHO) has encouraged the development of strategies which aimed reducing / eliminating the *Schistosoma mansoni* in endemic areas. The aqueous solutions of latex from *Euphorbia milii* (syn. *splendens*) var. *hislopii* has showed relevant characteristics such as the selective product in the control of the disease on a large scale. The presence in the environment of evolutionary stages (eggs, miracidia and cercariae) and the pre-patent and patent periods in the intermediate host are critical stages in the cycle development, as in these periods such forms are more susceptible to the action of products administered in water. This study will be presented in article format and will be divided into three chapters, namely: 1 - Effect of molluscicide *E. milii* var. *hislopii* on the development of *S. mansoni* in *Biomphalaria glabrata*, 2 - Control of the dynamics of parasite *S. mansoni* in *B. glabrata* by exposure of eggs and miracidia with *E. milii* var. *hislopii*, and, 3-Influence of the latex of *E. milii* var. *hislopii* in the formation of *S. mansoni* in its definitive host. Based on the results, we conclude that the molluscicidal and schistosomicidal propertie of the product in question, enabled by the action of the product in infectious forms and in the intermediate hosts, promotes concomitantly and efficiently the control of transmission and morbidity of the disease. It is a unique product, being natural, biodegradable, low-dose, ecologically viable and altering the development of the parasite cycle in the definitive and intermediate hosts, leading to the reduction of infectious forms and the preservation of mollusc populations in their natural habitat.

KEYWORDS: Control of schistosomiasis, molluscicide, schistosomicidal

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição das doenças negligenciadas por países no mundo	04
Figura 2. Mapa da distribuição global da esquistossomose no ano de 2008	06
Figura 3. Ciclo biológico de <i>Schistosoma mansoni</i>	08
Figura 4. Ovo de <i>Schistosoma mansoni</i> . 150µm x 60µm	08
Figura 5. Miracídio de <i>Schistosoma mansoni</i>	09
Figura 6. Cercária de <i>Schistosoma mansoni</i>	11
Figura 7. Mapa do número de pessoas internadas por esquistossomose no período de janeiro de 1998 a abril de 2011, no Brasil	13
Figura 8. Exemplar de <i>Euphorbia milii</i> (syn. <i>splendens</i>) var. <i>hislopii</i> N.E.B.	20

Capítulo I

Figura 9. Efeito da exposição a CL ₅₀ do látex de <i>Euphorbia milii</i> nas diferentes semanas de infecção de <i>Schistosoma mansoni</i> sobre a sobrevivência total de <i>Biomphalaria glabrata</i> infectada em laboratório, ao final do período experimental.	30
Figura 10. Efeito da exposição a CL ₅₀ do látex de <i>Euphorbia milii</i> na eliminação de cercárias de <i>Schistosoma mansoni</i> em diferentes semanas de infecção. Resultados do grupo tratado com relação ao seu grupo controle (em porcentagem).	34
Figura 11. Efeito global da exposição a CL ₅₀ do látex de <i>Euphorbia milii</i> na eliminação de cercárias de <i>Schistosoma mansoni</i> em diferentes semanas de infecção. Resultados do grupo tratado com relação ao seu grupo controle (em porcentagem).	35

Capítulo II

Figura 12. Efeito da exposição da CL ₅₀ do látex de <i>Euphorbia milii</i> na eclosão e/ou infecção de miracídios de <i>Schistosoma mansoni</i> na sobrevivência de <i>Biomphalaria glabrata</i> infectada em laboratório. C = grupo controle, INF+LAT = infecção na presença do látex, ECL+LAT = eclosão na presença do látex e ECL+INF+LAT = eclosão e infecção do miracídios no molusco na presença do látex.	50
--	-----------

Figura 13. Efeito do tratamento com a DI_{50} do extrato aquoso de *Euphorbia milii* (syn. *splendens*) var. *hislopii* na eclosão e/ou infecção de miracídios de *Schistosoma mansoni* na positividade *Biomphalaria glabrata* infectada em laboratório. C = grupo controle, INF+LAT = infecção na presença do látex, ECL+LAT = eclosão na presença do látex e ECL+INF+LAT = eclosão e infecção do miracídios no molusco na presença do látex. **51**

Figura 14. Relação entre a eliminação de cercária por *Biomphalaria glabrata* e o tempo (em dias) de infecção por *Schistosoma mansoni*. **53**

Capítulo III

Figura 15. Rack ventilado com para biotério com capacidade para 48 microisoladores **66**

Figura 16. Gotas de lugol contendo cercárias, durante observação em microscópio estereoscópio **67**

Figura 17. Infecção intra-cutânea de camundongos Swiss com 150 cercárias de *Schistosoma mansoni* **68**

Figura 18. Camundongos em cristalizadores para a coleta de fezes **69**

Figura 19. Lâminas de Kato-Katz **69**

Figura 20. Efeito da exposição com a CL_{50} do látex de *Euphorbia milii* (syn. *splendens*) var. *hislopii* na eliminação de ovos de *Schistosoma mansoni* em Swiss webster infectado em laboratório. Grupo 1= cercárias mantidas em água destilada durante o período de uma hora; Grupo 2= cercárias expostas ao látex durante o período de uma hora; Grupo 3= cercárias mantidas em água destilada durante o período de três horas; Grupo 4= cercárias expostas ao látex durante o período de três horas. **72**

Figura 21. Efeito da exposição com a CL_{50} do látex de *Euphorbia milii* (syn. *splendens*) var. *hislopii* na formação de *Schistosoma mansoni* em Swiss webster infectado em laboratório. Grupo 1= cercárias mantidas em água destilada durante o período de uma hora; Grupo 2= cercárias expostas ao látex durante o período de uma hora; Grupo 3= cercárias mantidas em água destilada durante o período de três horas; Grupo 4= cercárias expostas ao látex durante o período de três horas. **73**

Figura 22. Histopatologia do camundongo do grupo controle com 60 dias de infecção pelo *Schistosoma mansoni*. Presença de eosinofilia intensa em torno do ovo com miracídio em desintegração e alguns mononucleares permeando o infiltrado eosinofílico. Barra de 200 μ m. **74**

Figura 23. Histopatologia do camundongo do grupo exposto a CL₅₀ do látex de *Euphorbia milli* com 60 dias de infecção pelo *Schistosoma mansoni*. Presença de eosinofilia intensa em torno do ovo com miracídio em desintegração e alguns mononucleares permeando o infiltrado eosinofílico. Barra de 200 µm.

75

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

- Tabela 1.** Efeito da exposição a CL₅₀ do látex *Euphorbia milii* nas diferentes semanas de infecção de *Schistosoma mansoni* na biologia reprodutiva de *Biomphalaria glabrata* infectada em laboratório. 32
- Tabela 2.** Efeito da exposição a CL₅₀ do látex de *Euphorbia milii* nas diferentes semanas de infecção de *Schistosoma mansoni* na sobrevivência e na eliminação de cercárias por *Biomphalaria glabrata* infectada em laboratório. Dados em Log(x). Os números entre parêntese são referentes ao número de caramujos vivos e o símbolo (-) representa a ausência de caramujos. 34
- Tabela 3.** Efeito global da exposição a CL₅₀ do látex de *Euphorbia milii* na sobrevivência e na quantidade de cercárias de *Schistosoma mansoni* em *Biomphalaria glabrata* eliminadas durante as semanas de infecção, ao final do experimento. 34

Capítulo II

- Tabela 4.** Efeito da exposição a CL₅₀ do látex de *Euphorbia milii* (*syn. splendens*) var. *hislopii* na eclosão e/ou infecção de miracídios de *Schistosoma mansoni* na biologia reprodutiva de *Biomphalaria glabrata* infectada em laboratório. 51
- Tabela 5.** Efeito da exposição a CL₅₀ do látex de *Euphorbia milii* (*syn. splendens*) var. *hislopii* sobre a eliminação de cercárias por *Biomphalaria glabrata* infectada experimentalmente com *Schistosoma mansoni*. Dados em média e desvio-padrão. Resultados em Log₁₀(x).a,b,c = Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre as médias ($\alpha = 5\%$). 52

Capítulo III

- Tabela 6. Tabela 6:** Efeito da exposição com a CL₅₀ do látex de *Euphorbia milii* (*syn. splendens*) var. *hislopii* na biologia reprodutiva de *Schistosoma mansoni* em Swiss webster infectado em laboratório. Letras diferentes significam diferenças estatísticas entre o grupo ($\alpha = 5\%$). Grupo 1= cercárias mantidas em água destilada durante o período de uma hora; Grupo 2= cercárias expostas ao látex durante o período de uma hora; Grupo 3= cercárias mantidas em água destilada durante o período de três horas; Grupo 4= cercárias expostas ao látex durante o período de três horas. Dados em média \pm erro-padrão. 72

Tabela 7. Efeito comparativo da exposição com a CL₅₀ do látex de *Euphorbia milii* (syn. *splendens*) var. *hislopii* na biologia reprodutiva e formação de vermes adultos de *Schistosoma mansoni* em Swiss webster infectado em laboratório. Grupo 1= cercárias mantidas em água destilada durante o período de uma hora; Grupo 2= cercárias expostas ao látex durante o período de uma hora; Grupo 3= cercárias mantidas em água destilada durante o período de três horas; Grupo 4= cercárias expostas ao látex durante o período de três horas. **73**

Tabela 8. Efeito da exposição com a CL₅₀ do látex de *Euphorbia milii* (syn. *splendens*) var. *hislopii* na formação de vermes adultos de *Schistosoma mansoni* em Swiss webster infectado em laboratório. Letras diferentes significam diferenças estatísticas entre os grupo ($\alpha= 5\%$). Grupo 1= cercárias mantidas em água destilada durante o período de uma hora; Grupo 2= cercárias expostas ao látex durante o período de uma hora; Grupo 3= cercárias mantidas em água destilada durante o período de três horas; Grupo 4= cercárias expostas ao látex durante o período de três horas. Dados média \pm desvio-padrão **74**

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO GERAL	01
2- REVISÃO DE LITERATURA	04
2.1- Doenças Negligenciadas	04
2.2- Esquistossomose	05
2.3 - Ciclo biológico do <i>Schistosoma mansoni</i>	07
2.4 - Epidemiologia e Controle da Esquistossomose no Brasil	12
2.4.1- Métodos de controle da esquistossomose mansônica	15
2.4.2 - Tratamento quimioterápico	17
2.4.3 - Uso de moluscidas no controle da transmissão da esquistossomose	19
3- CAPÍTULO I - EFEITO DO MOLUSCICIDA <i>Euphorbia milii</i> (syn. <i>splendens</i>) var. <i>hislopii</i> NO DESENVOLVIMENTO DE <i>Schistosoma mansoni</i> EM <i>Biomphalaria glabrata</i>	24
Resumo	25
Abstract	26
3.1 – Introdução	27
3.2 – Material e Métodos	29
3.2.1- Obtenção do látex de <i>Euphorbia milii</i> (syn. <i>splendens</i>) var. <i>hislopii</i> e determinação da concentração letal e sub letal	29
3.2.2- Manutenção dos caramujos em laboratório e formação de grupos experimentais	29
3.2.3- Análise estatística	30
3.3 – Resultados	31
3.4 – Discussão	36
3.5 – Conclusão	39
3.6 – Referências Bibliográficas	40

4- CAPÍTULO II - CONTROLE DA DINÂMICA PARASITÁRIA DE <i>Schistosoma mansoni</i> (TREMATODA) EM <i>Biomphalaria glabrata</i> (PLANORBIDAE) ATRAVÉS DO TRATAMENTO DE OVOS E MIRACÍDIOS COM <i>Euphorbia milii</i> var. <i>hislopii</i> (EUPHORBIACEAE)	44
Resumo	45
Abstract	46
4.1 – Introdução	47
4.2 – Material e Métodos	49
4.2.1- Determinação da concentração letal e sub letal	49
4.2.2- Desenho experimental	49
4.2.3- Análise estatística	49
4.3 – Resultados	50
4.4 – Discussão	54
4.5 – Conclusão	57
4.6 – Referências Bibliográficas	58
	62

5- CAPÍTULO III - INFLUÊNCIA DO LÁTEX DE <i>Euphorbia milii</i> (syn. <i>splendens</i>) var. <i>hislopü</i> NA FORMAÇÃO DE <i>Schistosoma mansoni</i> NO HOSPEDEIRO DEFINITIVO	
Resumo	63
Abstract	64
5.1 – Introdução	65
5.2 – Material e Métodos	67
5.2.1 - Determinação da concentração letal e sub letal	67
5.2.2 – Animais	67
5.2.3 - Obtenção de cercárias e infecção	67
5.2.4 - Grupos experimentais	68
5.2.5 - Parâmetros analisados	69
5.2.6 - Análise estatística	71
5.3 – Resultados	72
5.4 – Discussão	77
5.5 – Conclusão	80
5.6 – Referências Bibliográficas	81
6- CONCLUSÕES GERAIS	84
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
8- ANEXOS	93
A- Produção científica do período acadêmico	

1. INTRODUÇÃO GERAL

A esquistossomose é uma doença crônica, debilitante e a mais importante doença helmíntica humana do mundo quanto à morbidez e mortalidade. É causada por cinco espécies de parasitos pertencentes ao gênero *Schistosoma* (Weiland, 1858): *S. haematobium* (Bilharz, 1852), *S. mansoni* (Sambon, 1907), *S. japonicum* (Katsurada, 1904), *S. intercalatum* (Fischer, 1934) e *S. mekongi* (Voge, Bruckner & Bruce, 1978). São epidemiologicamente distintas, pois necessitam de diferentes hospedeiros intermediários para completar o seu ciclo de vida e, durante o desenvolvimento no hospedeiro definitivo, afetam sistemas orgânicos distintos. As três primeiras espécies são consideradas de significativa importância em saúde pública e os moluscos envolvidos nos seus complexos ciclos de vida são: *Bulinus* sp. (Audouin, 1827) hospedeiro intermediário de *S. haematobium*, *Biomphalaria* sp. (Preston, 1910) de *S. mansoni* e *Oncomelaria* sp. (Gredler, 1881) de *S. japonicum*. O homem é o principal hospedeiro definitivo dos trematódeo deste gênero, entretanto, macacos, roedores e ruminantes podem desempenhar importante papel epidemiológico na manutenção destes parasitos.

A esquistossomose está entre as doenças parasitárias mais prevalentes do mundo e segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), atualmente há 240 milhões de pessoas infectadas, e 700 milhões vivem sob risco iminente de infecção por residirem em áreas endêmicas. Anualmente, 200 mil pessoas morrem em decorrência direta da doença na África subsaariana. Dentre os indivíduos parasitados, 10% apresentam a forma severa e mais de 100 milhões de pessoas apresentam algum tipo de manifestação clínica, constituindo assim, um grave problema de saúde pública (WHO, 2011). No Brasil, o único parasito do gênero *Schistosoma* autóctone é o *S. mansoni* e, segundo o Ministério da Saúde (MS), a prevalência da esquistossomose mansônica é de seis milhões de pessoas, distribuídas nas cinco regiões do país. As populações com maiores índices de infecção são as que apresentam hábitos agrícolas e pesqueiros, sendo as crianças o principal grupo etário atingido, devido ao uso recorrente de recursos hídricos contaminados para recreação. Atualmente, o aumento das populações humanas, sem o planejamento adequado de fornecimento de água potável e de tratamento de esgoto,

resulta no desenvolvimento de modificações ambientais que favorecem a manutenção de focos de transmissão da doença.

Para o controle da doença, a OMS recomenda a ação da quimioterapia à base de Praziquantel, para reduzir a prevalência e morbidade da doença. Entretanto, após duas décadas de intensa quimioterapia, o índice de pessoas infectadas por *S. mansoni* em todo mundo continua elevado. Aspectos como resistência ao composto utilizado e reinfecção após o tratamento são fatores importantes para a permanência da alta quantidade de indivíduos parasitados. Diante da problemática do controle da infecção esquistossomótica, a OMS tem estimulado o desenvolvimento de estratégias que objetivam a redução/eliminação do ciclo de *S. mansoni* em áreas endêmicas. A presença das formas evolutivas no ambiente (ovos, miracídios e cercárias) e os períodos pré-patente e patente no hospedeiro intermediário, são fases críticas do desenvolvimento do ciclo, dado que nesses períodos tais formas encontram-se mais susceptíveis a ação de produtos veiculados no recurso hídrico.

A aplicação de moluscidas, oriundos de produtos naturais nos focos de transmissão da doença tem recebido especial atenção por pesquisadores. Embora os produtos sintéticos utilizados sejam eficazes em eliminar o molusco do foco de infecção, apresentam ação biocida em organismos não-alvos da flora e da fauna, além de expressar níveis de genotoxicidade e efeito carcinogênico. Produtos derivados de plantas são uma alternativa aos efeitos indesejáveis encontrados nos moluscidas sintéticos estudados até o momento. Dentre os fitoterápicos bioativos para moluscos hospedeiros de *S. mansoni*, o látex de *E. milii* (syn. *splendens*) var. *hislopii* apresenta-se como o principal produto a ser utilizado em campanhas para o controle em larga escala da esquistossomose. A exposição do molusco *B. glabrata* a diferentes doses deste produto, acarretaram alterações na biologia reprodutiva e nos estoques de carboidratos, proteínas totais, uréia e ácido úrico, principalmente em moluscos infectados por *S. mansoni*.

A solução aquosa do látex de *E. milii* var. *hislopii* como moluscida natural já foi testado como produto seletivo no controle da esquistossomose. No entanto, estudos acerca da sua influência na manutenção do ciclo do *S. mansoni*, verificando a ação na sobrevivência, infectividade, ritmo de eliminação de cercárias e na formação de vermes

adultos de *S. mansoni* quando cercárias foram previamente expostas ao látex de *E. milii* var. *hislopii* ainda não foram publicados, tornando estes resultados inéditos e factíveis de patente.

Considerando-se a importância deste solução no combate a esquistossomose, o presente estudo foi elaborado com o objetivo de avaliar a ação da concentração sub-letal (CL₅₀) do látex de *E. milii* var. *hislopii* sobre ovos, formas infectantes (miracídios e cercárias) e o desenvolvimento de *S. mansoni* nos hospedeiros intermediários e definitivos. Tendo em vista o exposto, a presente dissertação apresentará o formato de artigo e será dividida em três capítulos, sendo eles:

- 1- Efeito do moluscicida *Euphorbia milii* var. *hislopii* (EUPHORBIACEAE) no desenvolvimento de *Schistosoma mansoni* (TREMATODA) em *Biomphalaria glabrata* (PLANORBIDAE),
- 2- Controle da dinâmica parasitária de *Schistosoma mansoni* (TREMATODA) em *Biomphalaria glabrata* (PLANORBIDAE) através do tratamento de ovos e miracídios com *Euphorbia milii* var. *hislopii* (EUPHORBIACEAE),
- 3- Influência do látex de *Euphorbia milii* var. *hislopii* (EUPHORBIACEAE) na formação de *Schistosoma mansoni* (TREMATODA) no hospedeiro definitivo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Doenças Negligenciadas

As Doenças Tropicais Negligenciadas (*Neglected Tropical Diseases* – NTDs) representam um grupo de doenças infecciosas e parasitárias (ascaridíase, ancilostomíase, tricuriase, filariose linfática, oncocercose, dracunculose, esquistossomose, Doença de Chagas, tripanossomíase humana africana, leishmaniose, hanseníase, tracoma, dengue e malária) que acometem principalmente países em desenvolvimento da África, Ásia, Caribe e da América do Sul (Figura 1) (HOTEZ *et al.* 2007; IOM, 2011). Tais doenças afloram em regiões onde o tratamento de água potável e de esgoto sanitário são inadequados, o *status* nutricional das pessoas é deficiente, os sistemas de saúde são rudimentares e a densidade de insetos e outros vetores de doenças são elevados no peri-domicílio e/ou nos principais locais de trabalho da população (WHO, 2007). O principal grupo socioeconômico afetado são pessoas carentes, que vivem com menos de US\$ 2 por dia, residentes no campo, em zonas de conflito ou em regiões urbanas de extrema pobreza. Nos últimos 40 anos, embora tenha sido observado um intenso aumento no número de fármacos desenvolvidos visando à redução dos impactos ocasionados por diferentes tipos de patologias, apenas 1,3% foi desenvolvido para doenças negligenciadas (LANCET, 2006).

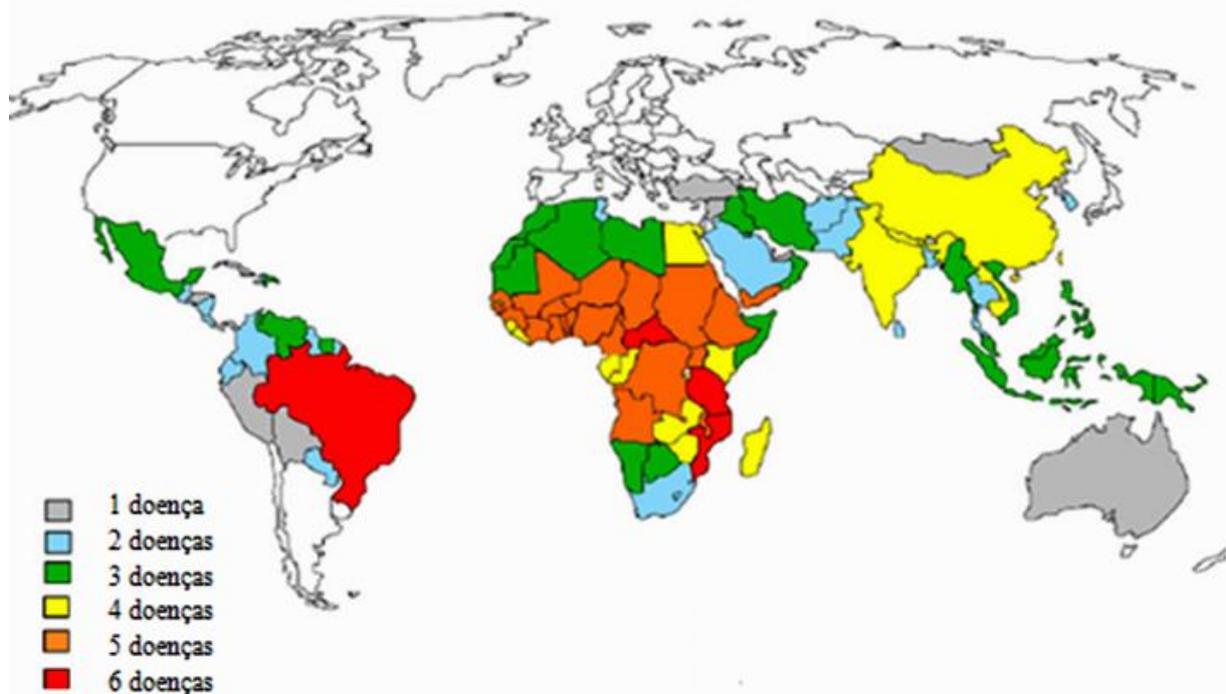


Figura 1. Frequência estimada das doenças negligenciadas por países no mundo. Dados adaptados de OMS/CDS/NTD (2007).

Estudos que utilizam dados de prevalência e mortalidade para mensurar a importância global de doenças, não são adequados para enfermidades que possam expressar estado crônico (BERQUIST *et al.* 2005). No intuito de refinar a análise da carga global de transtornos causados por determinada patologia, a OMS adotou o método de Anos de Vida Perdidos Ajustados por Incapacidade (*Disability-Adjusted Life Years – DALY*), esse índice estende o conceito de anos potenciais perdidos por morte prematura para incluir anos de vida deficiente devido à determinada enfermidade (WHO, 2009) e assim, o tempo vivido sob tal condição é determinante para esta análise.

Tomando como base o DALY, as Doenças Tropicais Negligenciadas apresentam um impacto global de 56,6 milhões de anos perdidos (HOTEZ *et al.* 2007) e dentre essas a esquistossomose contribuiu com 1.760.000 anos, seguida da Tripanossomíase Africana (1.598.000), Dengue (653.000), Chagas (649.000) e Hanseníase (177.000) (SIMÕES, 2005). Embora represente um grande avanço sobre as formas anteriores de estimar o real impacto das enfermidades, esse índice tem ação limitada quanto aos cálculos do grau de seqüelas mórbidas peculiares de cada doença e em cada grupo etário, subestimando assim algumas enfermidades (BERGQUIST *et al.* 2005). Por exemplo, quanto à esquistossomose, fatores como anemia, retardo no crescimento e danos ao desenvolvimento cognitivo de crianças em idade escolar não são considerados. Sendo assim, o Comitê de Especialistas da OMS estima que o impacto da esquistossomose possa chegar a 5,8 milhões de anos de vida perdidos, ficando atrás somente da malária e tuberculose (OLDS *et al.* 1999; BERGQUIST *et al.* 2005).

2.2. Esquistossomose

A esquistossomose continua sendo um grave problema de saúde pública em várias partes do mundo (Figura 2), particularmente na África, onde ocorrem 85% dos casos e mais de 200 milhões de pessoas foram infectadas no ano de 2009. Na América Latina e no Caribe é causada exclusivamente pelo trematódeo *S. mansoni*, sendo endêmica em St. Lucia, Guadalupe, Martinica, Suriname, República Dominicana, Venezuela, Brasil e em Porto Rico (WHO, 2011).

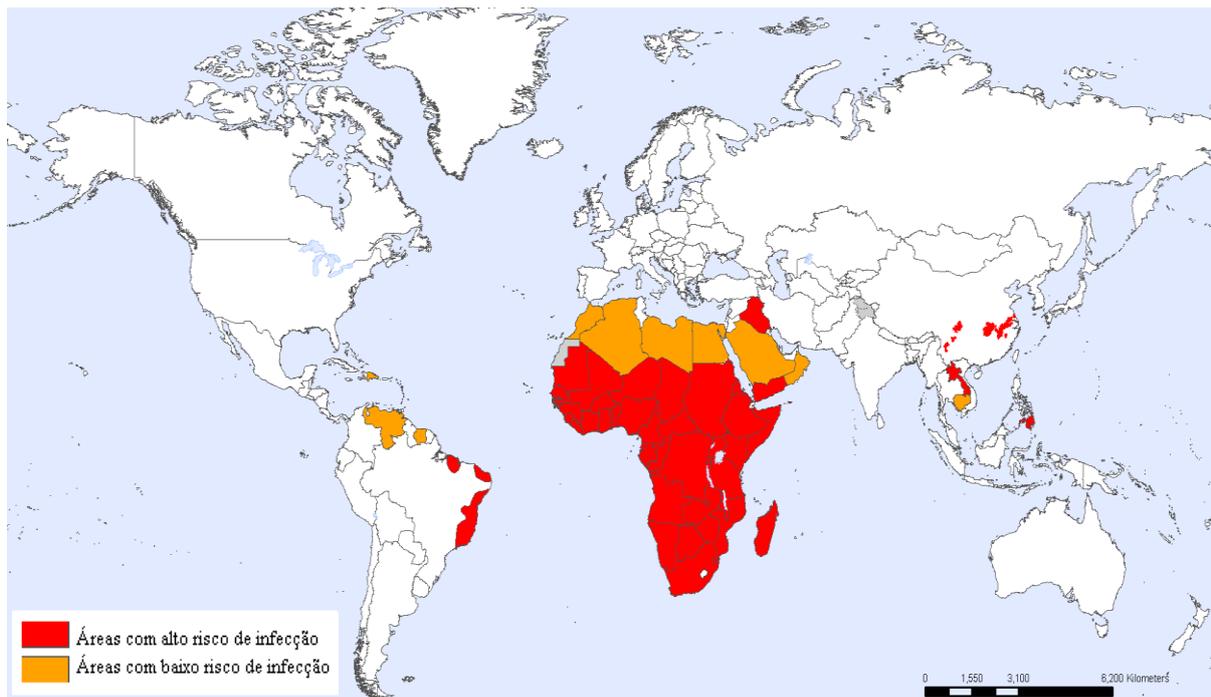


Figura 2. Mapa da distribuição global da esquistossomose no ano de 2008. Fonte: WHO, 2011. Adaptado pelo autor.

O helminto *S. mansoni* é pertencente ao filo Platyhelminthes, Classe Trematoda, Subclasse Digenea, Ordem Strigeiforme, Superfamília Schistosomatoidea, Família Schistosomatidae, Gênero *Schistosoma* (OLSON *et al.* 2003). Esse parasito em sua fase adulta habita o sistema venoso de mamíferos, apresenta dimorfismo sexual e os machos possuem um sulco ventral denominado canal ginecóforo. Tal estrutura é uma característica plesiomórfica do gênero, bem como o pequeno número de testículos (SILVA *et al.* 2008). A origem filogenética do grupo *mansoni* é controversa, sendo mais aceita a teoria desenvolvida por Combes (1990), onde o centro irradiador do gênero seria a Ásia e após migração parasitando pequenos mamíferos para a África, houve o surgimento do grupo *mansoni*. A colonização de hominídeos ocorreu devido à transferência lateral a partir de pequenos roedores (LENZI *et al.* 1997).

Atualmente, o homem é o principal hospedeiro definitivo do *S. mansoni*, entretanto outros mamíferos podem atuar como reservatórios em áreas de transmissão devido à capacidade de manter o ciclo do parasito em condições naturais e laboratoriais atuando como reservatórios (AMORIN, 1953; MALDONADO Jr. *et al.* 2006). Em infecções naturais, os roedores mais frequentemente capturados são *Holochilus brasiliensis*, *Nectomys squamipes* e com menor frequência em *Oxymycterus* sp. (MALDONADO Jr. *et al.* 2006). Quanto aos animais de produção, Modena *et al.* (1993,

2008) descreveram a importância epidemiológica da infecção de bovinos pelo *S. mansoni*. Tais autores sugerem que na última década, devido à expansão do agronegócio e da comercialização do gado sem um controle sanitário eficiente, estes animais podem estar colaborando com a dispersão da doença no país.

2.3- Ciclo biológico do *Schistosoma mansoni*

O complexo ciclo biológico de *S. mansoni* é realizado em três ambientes distintos (límnico, molusco e vertebrado), sendo este trematódeo capaz de alterar drasticamente sua morfologia e fisiologia durante o desenvolvimento até a fase adulta (Figura 3). Pode-se iniciar a descrição do ciclo de *S. mansoni* com a eliminação, pelas fezes do hospedeiro vertebrado, dos ovos do parasito em coleções de água doce. O ovo de *S. mansoni* apresenta 150 µm de comprimento por 65 µm de largura, com um espículo lateral na porção posterior medindo 20 µm (Figura 4). Não apresentam opérculos e normalmente contém uma única larva denominada miracídio em seu interior (REY, 2008). Devido à associação de múltiplos fatores como a hipotonicidade do meio, temperatura, luminosidade e à própria movimentação do embrião, há a eclosão da larva miracídio (Figura 5) - forma larval de vida livre - que penetra pela parte mole de moluscos do gênero *Biomphalaria* (NEVES, 2005).



Figura 3. Ciclo biológico de *Schistosoma mansoni*. Fonte: Schall *et al*, 2007.

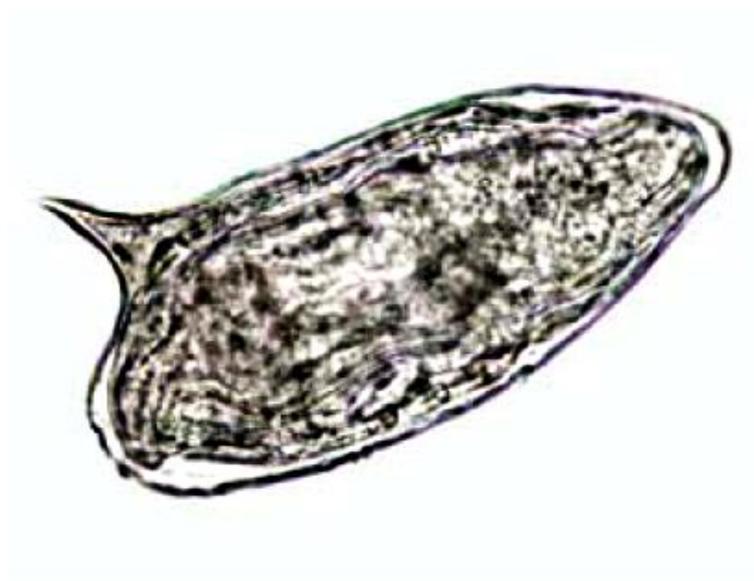


Figura 4. Ovo de *Schistosoma mansoni*. 150µm x 60µm. Fonte: Despommier *et al*, 2005.

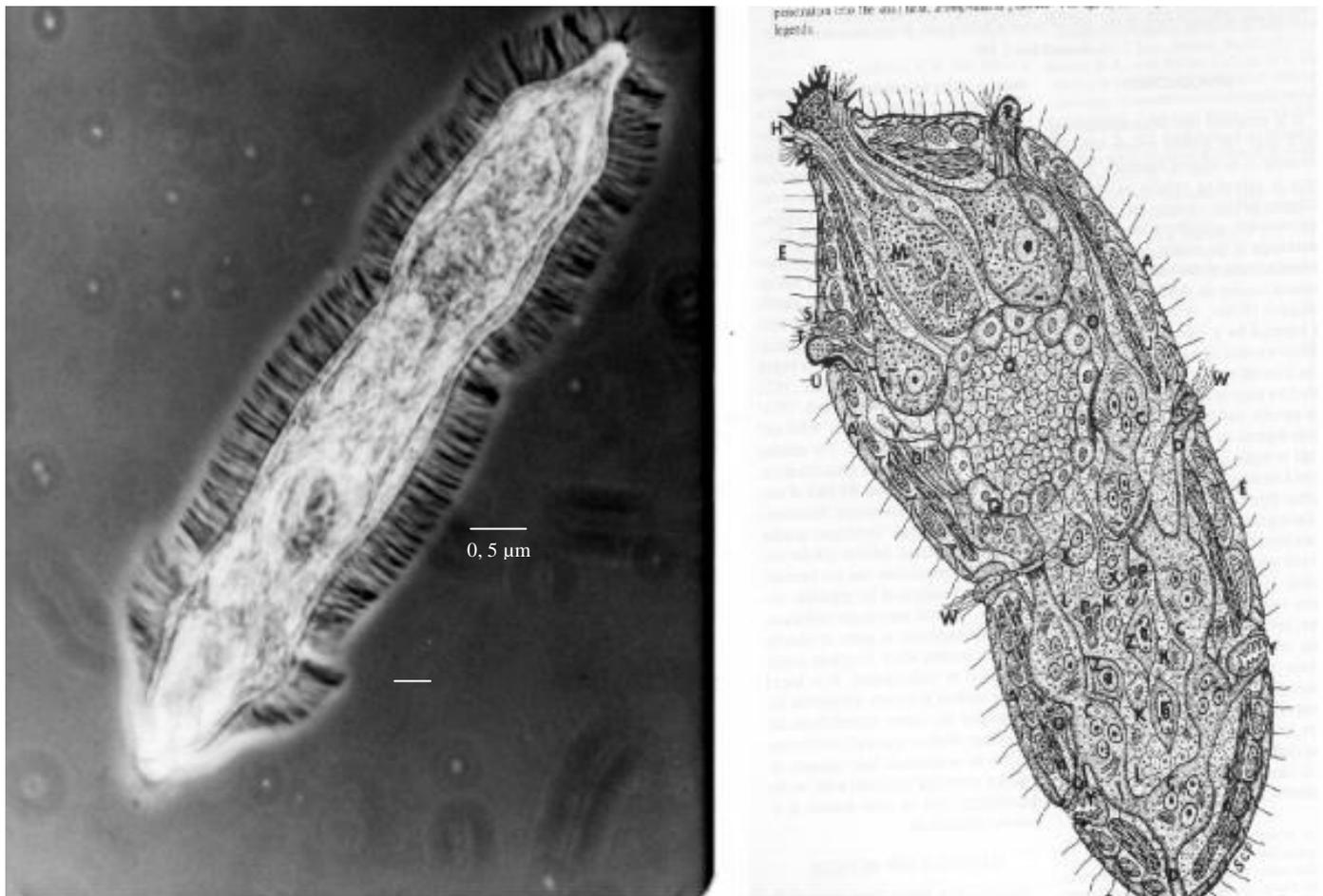


Figura 5. Miracídio de *Schistosoma mansoni*. A esquerda: fotografia de microscopia sob contraste de fase. A direita: reconstituição artística da anatomia interna do miracídio, baseada em microscopia eletrônica. Fonte: Pan, 1980.

Os miracídios são larvas que medem entre 160-180µm de comprimento por 60 µm de largura. Sua região anterior é constituída por uma papila apical (*terebratorium*), glândulas adesivas e de penetração, além receptores sensoriais (REY, 2008). Possuem fototropismo positivo e quando liberado do ovo, tem atividade de 8-12 horas para encontrar e penetrar no hospedeiro intermediário. A localização do hospedeiro é dependente de quimiorreceptores localizados nas células nervosas do miracídio, que são sensíveis a glicoconjugados presentes no muco do molusco (CARVALHO *et. al.* 2008). O processo de penetração ocorre nas partes moles do molusco através de secreções glandulares do *terebratorium* e movimentos rotatórios, tem duração de 3 a 15 minutos, sendo acelerado por temperaturas mais altas (GUIMARÃES, 2007). Após a penetração, a larva perde o revestimento epitelial ciliado em um período de 2 horas, sendo as demais estruturas de penetração, substituídas gradualmente. No segundo dia, uma nova camada

superficial contínua é formada, dando origem ao esporocisto primário ou mãe. A nutrição e excreção nesse estágio evolutivo são realizadas diretamente pelo tegumento do esporocisto.

No 14º dia após a penetração, o esporocisto primário se enovela e aumenta de tamanho, apresentando de 150 a 200 células germinativas e iniciam o processo de migração para a glândula digestiva e o ovoteste do molusco. Nessa fase, o esporocisto sofre modificações anatômicas, sendo chamado de esporocisto filho ou secundário, que resultam na formação da região anterior, onde se localiza o poro de nascimento cercariano; região mediana com cercárias em processo de diferenciação e; região posterior com células indiferenciadas. Após três ou quatro semanas de desenvolvimento são formadas as cercárias (larvas infectantes para hospedeiro vertebrado) (NEVES *et al.* 2005). É importante ressaltar que um molusco infectado por um único miracídio pode liberar milhares de cercárias durante muitos meses. Esse mecanismo é explicado pela ocorrência de esporocistos replicadores, capazes de produzir novas gerações de esporocistos produtores de cercárias. Após atravessar o poro de nascimento cercariano, a larva rompe o tegumento do molusco e entra novamente em contato com o ambiente límnico.

A permeabilidade do tegumento da cercária é controlada pelo glicocálix, molécula de oligossacarídeos disposta na superfície da membrana plasmática trilaminada. A cercária mede cerca de 500 µm de comprimento, divididos entre o corpo, com 200 µm e a cauda bifurcada, com 300µm. A região anterior do corpo cercariano é especializada na fixação e penetração no hospedeiro, sendo formada pela ventosa oral, ventosa ventral (acetábulo), células do sistema digestivo, excretor e nervoso, papilas sensoriais e células germinativas responsáveis pela formação dos órgãos sensoriais na fase adulta (Figura 6). As cercárias recém-eliminadas são extremamente ativas e recebem múltiplos estímulos do ambiente. Seus movimentos são estimulados principalmente quando sinais químicos (L-arginina) da pele do hospedeiro entram em contato com as papilas sensoriais (CARVALHO *et al.* 2008).



Figura 6. Cercária de *Schistosoma mansoni*. Fonte: Sciencephotolibrary.com.

Após o encontro com o hospedeiro definitivo compatível, inicia-se o processo de fixação e penetração que dura em torno de 15 minutos. Segundo, Haas *et al.* (2002), a fixação na pele do hospedeiro é estimulada por L-arginina e assegurada por ceramidas e acilgliceróis. A penetração é consequência da conjugação do intenso movimento da cercária e secreções glandulares. A 2ª transição do ambiente aquático para o interior do hospedeiro é novamente acompanhada de intensas modificações morfológicas e anatômicas. Na transição cercária-esquistossômulo, o tegumento torna-se especializado para atuar diretamente com as trocas com o ambiente, pela perda do glicocálix. A cauda é outra estrutura perdida e a respiração passa a ser anaeróbia.

Depois das transformações, os esquistossômulos invadem os vasos sanguíneos do seu novo hospedeiro, seguindo pela circulação sanguínea em direção ao coração e aos pulmões. Após uma semana, os esquistossômulos podem ser encontrados no sistema

porta intra-hepático, onde se alimentam de sangue, crescem e amadurecem num prazo de 28 a 40 dias. Com o amadurecimento sexual de machos e fêmeas há o acasalamento e a formação do casal parasitário que se desloca contra a corrente circulatória do sistema porta para as veias mesentéricas inferiores e seus ramos. As vênulas da parede do reto são os locais de oviposição das fêmeas fecundas. Parte dos ovos postos cai na luz intestinal e se misturam com o bolo fecal, sendo eliminados nas fezes. Outra parte retorna através da circulação sanguínea para o fígado, onde dão origem as granulomas periovulares hepáticos, lesão patognômica da esquistossomose.

2.4- Epidemiologia e Controle da Esquistossomose no Brasil

A análise comparativa entre o DNA mitocondrial da linhagem de *S. mansoni* Americano e Africano, sugere que a introdução deste parasito nas Américas teve início devido ao tráfico de escravos realizado entre o século XVI a XIX (DESPRÈS *et al.* 1993).

Com o registro do primeiro caso de esquistossomose no Brasil, por Pirajá da Silva em 1908, iniciaram-se levantamentos epidemiológicos para o conhecimento da doença no país. Lutz & Penna (1918) durante expedição do Instituto Oswaldo Cruz elaboraram um extenso relatório sobre a situação da doença nos estados do nordeste brasileiro e, Madureira-Pará (1949) durante a campanha nacional de erradicação da febre amarela, observou que das 6.000 amostras de exames de fezes coletadas 2,3% apresentavam ovos de *S. mansoni*, sendo os estados de Alagoas, Sergipe e Pernambuco os mais afetados.

Atualmente, o Brasil é o maior país das Américas em áreas de transmissão da esquistossomose, sendo considerados endêmicos os estados do Maranhão até o Espírito Santo, também são encontrados focos de transmissão historicamente conhecidos no Distrito Federal, Pará, Piauí, Goiás, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (COURA & AMARAL, 2004).

As informações sobre a distribuição e localização geográfica dos moluscos hospedeiros intermediários da esquistossomose no Brasil são importantes para determinar a localidade de ocorrência e a abrangência dos sítios epidemiologicamente ativos no país. Tais dados são armazenados no bancos de dados fornecidos pela

Gerência Técnica de Esquistossomose da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde do Brasil, pelo Laboratório de Helmintoses Intestinais do Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz e pelo Departamento de Malacologia do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz. Dentre as espécies de *Biomphalaria* encontradas naturalmente infectadas, *B. glabrata* merece especial atenção por estar quase sempre associada à distribuição da esquistossomose. De fato, *B. glabrata* já foi notificada em 16 estados brasileiros, além de no Distrito Federal, e em 806 municípios de uma área delimitada pelos paralelos 0° 53'S (Quatipuru, PA), 29° 51'S (Esteio, RS), 53° 44'S (Toledo, PR) e a linha costeira (MS, 2007).

Com base no Sistema Único de Saúde (SUS), durante o período de janeiro de 1998 a abril de 2011, foram detectados 11.768 casos de internação hospitalar por conta da esquistossomose, em todos os estados do país (figura 4). Fatores como o diagnóstico impreciso e o desenvolvimento silencioso em 90% das pessoas parasitadas, mascaram o real estado da doença no país, onde segundo o Ministério da Saúde, seis milhões pessoas estão infectadas (KATZ & PEIXOTO, 2000). É importante ressaltar que a internação por conta da esquistossomose é um indicador relacionado à morbidade da infecção e não contempla os casos leves da doença, pois somente os casos graves ou agudos são sintomáticos.

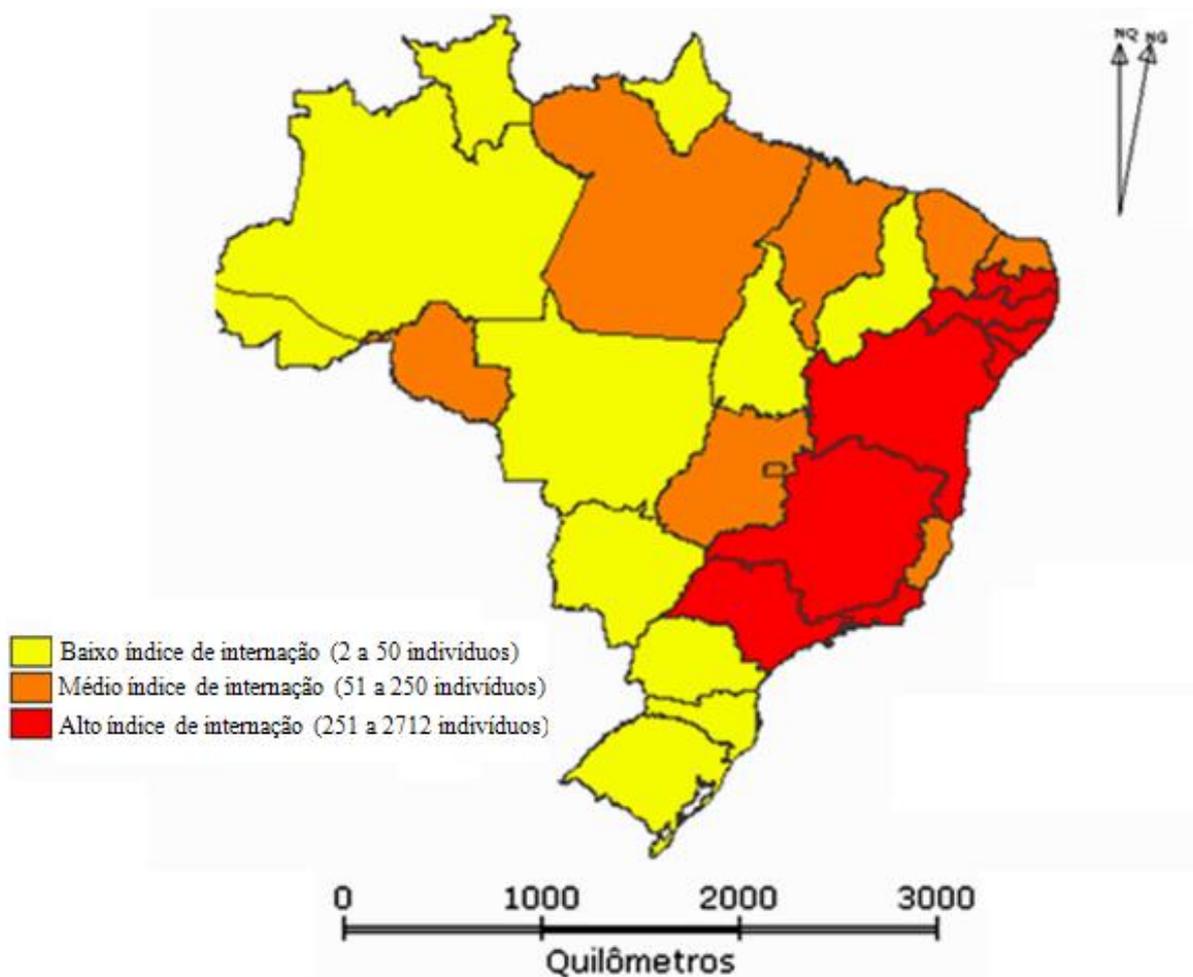


Figura 7. Mapa do número de pessoas internadas por esquistossomose no período de janeiro de 1998 a abril de 2011, no Brasil. Dados adquiridos no sistema DataSUS.

A preocupação com o real estado da esquistossomose no Brasil iniciou-se com o inquérito nacional realizado pela Divisão de Organização Sanitária, entre os anos de 1947 a 1952 (PELLÓN & TEIXEIRA, 1950). Com base nesse estudo o governo federal criou, em 1975, o Programa Especial de Controle da Esquistossomose (PECE), que a partir de 1980 transformou-se no Programa de Controle da Esquistossomose do Sistema de Vigilância em Saúde (PCE/SVS). Atualmente, o referido programa é reconhecido como um dos mais ativos do mundo, devido ao intenso trabalho de vigilância através de levantamentos coparasitológicos nacionais e suas ações ativas de pesquisas com o caramujo hospedeiro (WHO, 2011). As diretrizes das medidas de controle do programa estiveram sustentadas ora na morbidade e ora no controle da transmissão da doença, no decorrer dos anos de atuação.

Como medida para o controle da morbidade, tem sido preconizado o uso de quimioterápicos como Oxamniquine e Praziquantel. Esses compostos promoveram a redução na prevalência da doença no país, entretanto estas medidas não conferem proteção contra re-infecções mediante o novo contato com formas infectantes. Embora a prevalência tenha sido claramente reduzida através dos anos, a morbidade e a mortalidade da esquistossomose permanecem elevadas (ENGLENS *et al.* 2002).

Para o controle da transmissão da esquistossomose, o uso de produtos químicos é o que apresenta os resultados mais promissores. Tais medidas reduzem drasticamente os estoques populacionais de moluscos vetores e assim, o número de caramujos infectados e formas infectantes para o hospedeiro definitivo (cercárias) também são reduzidas. Neste sentido, o uso de produtos químicos no combate aos caramujos vetores tem sido uma importante ferramenta na redução dos níveis prevalência em áreas endêmicas (BARBOSA *et al.* 2008).

Atualmente a principal medida de controle, preconizada pela OMS, é o uso do quimioterápico Praziquantel para a redução da morbidade da doença, além de controlar outras parasitoses, como as geohelmintoses. Para redução da transmissão tem sido sugerido o uso de moluscidas como medida complementar em criadouros de importância epidemiológica. Devido à problemática da resistência dos quimioterápicos e o surgimento de novas áreas de transmissão da doença, o controle da esquistossomose, com o foco nos hospedeiros intermediários, tem sido propagado através da literatura vigente pautado principalmente na questão ecológica do uso de moluscidas naturais.

2.4.1 - Métodos de controle da esquistossomose mansônica

A partir da década de 50, a Organização Mundial da Saúde (OMS) assume posição de destaque na elaboração e estímulo a pesquisas de controle da esquistossomose em todo o mundo (WHO, 1953). A cada década, relatórios descrevendo os avanços alcançados e sinalizando as diretrizes para os próximos 10 anos são produzidos pelo Comitê de Especialista da OMS. Entretanto, após décadas de ações de controle da esquistossomose (BINA, 1992; BARBOSA, 1995), observamos que sua distribuição e prevalência, em escala mundial, continuam a aumentar (GUIMARÃES, 2007).

Rey (2008) discorre sobre medidas básicas que devem ser empregadas para reduzir ou impedir a transmissão da doença de forma imediata. As ações sugeridas pelo autor baseiam-se, principalmente, no uso de moluscidas eficazes, com posterior tratamento da população infectada, a fim de reduzir as fontes de infecção. Entretanto, pela complexidade do ciclo e as peculiaridades de cada zona endêmica, há a necessidade do estudo epidemiológico prévio da região, a fim de selecionar a melhor técnica de controle. As análises dos aspectos geográficos e socioeconômicos da localidade em questão são extremamente importantes para a eficácia do programa de controle.

No intuito de controlar a endemia de maneira preventiva, muitos pesquisadores se dedicam a descoberta de candidatos vacinais (Tandler, et al 1996; Berquist & Colley, 1998). Dentre os candidatos vacinais, Sm14 é o único caracterizado por pesquisadores brasileiros. Esse é um antígeno de 14 KDa presente no esquistossomulo e adulto. Tal proteína oferece atividade protetora contra *Fasciola hepatica*, um trematódeo que causa grandes perdas econômicas na indústria da pecuária. Em experimentos de vacinação com camundongos, a vacina conferiu atividade protetora de 67% (CARVALHO et al. 2008). Embora tais resultados sejam animadores, a vacina não confere proteção total contra a esquistossomose e ainda se encontra em fase de teste clínico.

Atualmente a OMS associa o controle da esquistossomose ao das geohelminoses (WHO, 2002) e sinaliza como grupo de alto risco, crianças em idade escolar e grupos que possuem forte vínculo com os recursos hídricos potencialmente infectáveis, como pescadores, agricultores e lavadeiras (BARBOSA *et al.* 2008). Ações como: saneamento ambiental, educação em saúde e controle ambiental dos moluscos hospedeiros são medidas auxiliares ao tratamento quimioterápico (BARBOSA *et al.* 2008).

No que tange a esquistossomose, ações de saneamento ambiental estão associadas a modificações ambientais para redução das populações de moluscos e ao tratamento do esgoto sanitário antes do lançamento em corpos hídricos, impedindo, desse modo, a contaminação dos hospedeiros intermediários por miracídeos (BARBOSA *et al.* 2008). Essas ações são comprovadamente eficazes para o controle e eliminação de grande parte das geohelminoses e esquistossomoses em todo o mundo. Tais medidas, entretanto, são de longo prazo e necessitam de volumosos investimentos

públicos. Curiosamente, Rey (2008) afirma que as medidas de saneamento implantadas de forma isolada promovem efeito limitado e ressalta que as medidas devem estar combinadas com a quimioterapia e o uso de moluscidas.

Atividades referentes à educação em saúde são capazes de reduzir a transmissão da esquistossomose, através da conscientização ambiental e identificação de comportamentos de risco por parte da população residente na área endêmica (MELLO-SILVA, 2005). Com base nestes conceitos, Gazinelli *et al.* (2003) descreveram uma experiência interventiva com alunos e professores de uma instituição de ensino pública de Minas Gerais. O significado da doença e a importância da conservação do recurso hídrico foram chaves do processo interventivo. Observou-se que a doença não era considerada uma necessidade em saúde e sim uma enfermidade normal, pois não causava morte. O estudo foi pautado na revisão da postura frente ao recurso hídrico, fonte de subsistência para aquela população. Foram propostas ações para tornar o rio mais saudável e conseqüentemente controlar a transmissão da doença.

Com atividades que proporcionem a sensibilização da população para a doença, os próprios moradores poderão reconhecer os sintomas e buscar diagnóstico e tratamento. Além disso, serão capazes de identificar localmente os focos de transmissão, pela presença dos moluscos e assim adotar, autonomamente, medidas para o controle da transmissão.

2.4.2 - Tratamento quimioterápico

O método de controle curativo/preventivo com base no uso de substâncias quimioterápicas tem sido intensamente estimulado pela OMS nas últimas décadas devido, entre outros fatores, ao seu baixo custo e a grande eficácia com reduzida toxidez (FENWICK *et al.* 2009; FENWICK & WEBSTER, 2006). A utilização das drogas Oxamniquine e Praziquantel (PZQ) no combate de *S. mansoni*, possibilitaram significativa redução no custo do tratamento no decorrer das últimas décadas. Segundo Fenwick *et al.* (2009), nos últimos 20 anos, o preço por tablete de PZQ reduziu 90%, sendo, em 2008, o custo da droga para tratar uma criança de US\$ 0,20.

O PZQ é eficaz em todas as formas de esquistossomoses. A facilidade no tratamento por via oral, na dose única de 40mg/kg de peso corporal ou duas doses de 25

a 30 mg/kg nas hiper-infecções, separadas por intervalo de 4 horas é um facilitador para a eficácia do tratamento (DAVIS & WAGNER, 1979). A taxa de cura varia de 70 a 100% e os efeitos colaterais são raros e passageiros, consistindo principalmente em náuseas, dor epigástrica, diarreia, tonturas e sonolência. Em crianças com idade escolar promove uma redução na incidência de formas hepatoesplênicas, renal, genital, cerebral e medular da esquistossomose (RITCHTER, 2003). Quanto ao Oxamniquine, seu uso também é por via oral, em dose única de 15 mg/kg para os adultos e 20 mg/kg para as crianças com menos de 30 kg, dividindo em duas doses com intervalo de 4 a 6 horas. Nos pacientes não curados, há redução da ordem de 80 a 90%, na eliminação de ovos e, em geral, o tratamento é bem tolerado, mas pode provocar tonturas, sonolência e cefaléia, náuseas, vômitos ou diarreia (REY, 2008). Possui contra indicação para pessoas com antecedentes neurológicos, pois pode provocar excitação mental, alucinações ou convulsões, que regridem em menos de seis horas.

Olliaro *et al.* (2011), testaram a eficácia de duas dosagens (60 mg/kg e 40 mg/kg) de PZQ sobre as esquistossomoses (causadas por *S. mansoni* e *S. japonicum*) em quatro sítios de infecção distintos (Filipinas, Mauritânia, Tanzânia e Brasil). Os autores concluíram que não houve diferença entre as doses do medicamento para as duas formas da doença e os resultados foram corroborados pela dose recomendada pela OMS.

Muitos autores situam em caráter de urgência a necessidade do desenvolvimento de novos grupos de bases para o controle da esquistossomose (KATZ, 2008; PICAMATTOCCIA & CIOLI, 2004), pois de maneira geral, o reduzido número de compostos utilizados para o controle de qualquer endemia, está sujeito ao aparecimento de linhagens resistentes e de fato, é o que tem se observado com as bases utilizadas para a esquistossomose. A diferença de tolerância a Oxamniquine e PZQ (GRYSEELS *et al.* 2001), e a indução, em laboratório, de resistência a linhagens de diferentes espécies de *Schistosoma*, incluindo a mansônica, abre espaço a hipótese que dentro de pouco tempo, poderão ser encontradas resistências, principalmente nos países onde há maior utilização destes medicamentos.

Atualmente, a quimioterapia associada à luta antivetorial é a arma mais eficaz no controle da endemia no caso da esquistossomose intestinal (KATZ, 2003). Tal medida reduz drasticamente as fontes de infecção humana e limita as taxas de transmissão.

Entretanto, o sucesso das ações de controle é dependente de um sistema de vigilância epidemiológica eficiente, que execute de maneira conjunta, a atividade contra o hospedeiro intermediário e o tratamento dos eliminadores de ovos de *Schistosoma* no ambiente.

2.4.3 - Uso de moluscidas no controle da transmissão da esquistossomose

Até o desenvolvimento de quimioterápicos seguros e eficazes para o tratamento em larga escala, o controle da esquistossomose era realizado basicamente objetivando a redução dos hospedeiros intermediários (BARBOSA *et al.* 2008). Embora tais fármacos tenham sido responsáveis por significativa redução da morbidade da doença, a diminuição na transmissão do parasito não foi alcançada (OLIVEIRA, 2006). O combate ao hospedeiro tem sido tentado por diferentes métodos que incluem: emprego de moluscidas sintéticos, tais como niclosamida (WHO, 1993), moluscidas de origem vegetal (JURBERG, 1989; SCHALL *et al.* 1998), modificação do seu habitat natural e utilização de predadores ou competidores (LARDANS & DISSOUS, 1998). Segundo Katz (2003), programas baseados no controle da morbidade são insuficientes para conter a incidência da esquistossomose, sendo necessárias ações que associem tanto a diminuição da morbidade como da transmissão, interrompendo o ciclo evolutivo do parasito.

Teles & Carvalho (2008), afirmam que apesar do desenvolvimento de drogas altamente eficazes na diminuição da morbidade da esquistossomose, a única atividade profilática que apresenta a possibilidade da interrupção da transmissão é o emprego de substâncias moluscidas nos focos endêmicos. O uso de moluscidas é, em geral, recomendado para áreas rurais e urbanas onde os possíveis prejuízos ambientais decorrentes do uso destes produtos não são maiores que os resultantes da própria contaminação humana com detritos e dejetos (TELES & CARVALHO, 2008). A OMS preconiza o uso de produtos oriundos de plantas em baixas doses (< de 100ppm), que resultem em alta mortalidade de moluscos. Para o uso de plantas moluscidas foram propostos quesitos como: apresentar crescimento anual e adaptabilidade em diferentes condições locais, localização da atividade moluscida em partes de fácil regeneração na planta e utilização preferencial em extratos aquosos. As aplicações devem priorizar coleções hídricas de pequeno porte como açudes, lagoas, poços e riachos de pouca extensão, pois a quantidade e a dificuldade de dispersão das substâncias são aspectos que limitam a eficiência das técnicas de controle.

O uso de moluscidas torna-se a ação de controle com melhor relação custo-benefício em regiões onde há dificuldade de acesso ao PZQ, seja pela logística do tratamento em massa ou pelo valor do medicamento. De acordo com o Comitê de Especialistas no Controle da Esquistossomose (WHO, 1973), é notório que projetos que se baseiam somente no uso de substâncias moluscidas tem um claro impacto na incidência e infecção da esquistossomose. Tal medida foi utilizada com sucesso nos programas de controle de Gana, Tanzânia, Egito e Japão (WEBBE, 1985). Em outros países, como Brasil e Zimbábue, foi possível observar intensa redução na prevalência da infecção após a associação de tratamentos quimioterápicos com o uso de moluscidas em seus programas (PAULINI *et al.* 1972; SHIFF *et al.* 1973).

O uso de substâncias moluscidas em campanhas de controle da esquistossomose no Brasil baseou-se exclusivamente na utilização de niclosamida (2',5-dicloro-4'-nitrosalicilanilida), um sal de etanolamina distribuído comercialmente como Bayluscide[®]. Este produto é altamente eficaz quando comparado com outros moluscidas sintéticos, sendo ativo para caramujos a partir de 0.50g m⁻³.

Dentre os estudos realizados para avaliar a ação deste produto em diferentes situações eco-epidemiológicas, Barreto & Prata (1971) utilizando apenas aplicações bimensais, em Taquarandi (Bahia), tendo como controle Caatinga do Moura (Bahia), obtiveram redução significativa na abundância de caramujos na área experimental, sendo menor o diâmetro dos caramujos sobreviventes ao tratamento. Utilizando metodologia similar, Paulini & Dias (1971) reduziram em 97% o índice de caramujos infectados pelo *S. mansoni* em cinco áreas de Belo Horizonte, MG, onde a população tinha características mais urbanas que nas comunidades estudadas no Nordeste. Takougang *et al.* (2006), utilizando a dose de 0,50 g/m³ aplicado em duas vezes de 0,25 g/m³ obtiveram alta mortalidade entre os caramujos alvos e baixa letalidade para peixes, sapos e girinos. Os autores reconhecem que os efeitos sobre outros organismos aquáticos diminuem a aceitabilidade do Bayluscide[®] e sugerem que mais estudos são necessários para avaliar a relação custo-benefício desse produto no controle da esquistossomose.

Apesar dos promissores resultados obtidos a partir do Bayluscide[®], este composto, nas doses recomendadas, apresenta atividade biocida em organismos não-

alvos como plantas e animais, genotoxicidade e efeito carcinogênico (HAMED, 2010). Estes fatores, associados ao alto custo do produto, à possibilidade de recolonização após a interrupção do tratamento, a alta toxicidade ecológica e a resistência desenvolvida pelo uso exclusivo em indivíduos do gênero *Biomphalaria*, são fatores limitantes para o uso oficial deste composto em programas de controle de larga escala (MELLO-SILVA *et al.* 2006; HAMED 2010). Neste sentido, pesquisas de compostos de origem vegetal, com atividade moluscidas em baixas doses, biodegradáveis, mais baratos e menos agressivos ao ambiente tem sido intensamente pesquisadas (MELLO-SILVA *et al.* 2006; SINGH *et al.* 2010; VASCONCELLOS & AMORIN, 2003; LIMA, 2010; HAMED, 2010; YADAV & JAGANNADHAM, 2008; SCHAL *et al.* 1998; AUGUSTO *et al.* 2011).

Dentre os grupos botânicos pesquisados, espécimes da família Euphorbiaceae apresentam atividade moluscida maior que qualquer moluscida sintético para hospedeiros intermediários de parasitos de importância médica e veterinária (SINGH & AGARWAL, 1984). Das espécies pertencentes a esta família, *Euphorbia milii* var. *hislopii* N.E.B. (Figura 8) é a mais promissora para o uso em programas oficiais de controle da esquistossomose de acordo com a OMS (WHO, 2002; MELLO-SILVA *et al.* 2006).



Figura 8. Exemplar de *Euphorbia milii* var. *hislopii* N.E.B. Fonte: MS, 2007

Esta planta é originária de Madagascar, África, mas é cultivada em todo mundo para a finalidade paisagística (BAPTISTA *et al.* 1992). É facilmente cultivável, pois não necessita cuidados com o solo, fertilizantes e cuidado frequente com água (SCHALL *et al.* 2001). A atividade moluscicida deste látex foi descrita por Vasconcellos & Schall (1986) contra moluscos do gênero *Biomphalaria* em concentrações menores que 0,5 ppm e patenteada pelo IOC-FIOCRUZ/RJ em 1998.

Atualmente, a atividade biocida do látex foi testada frente a organismos como *Megaselia scalaris* (Phoridae), moluscos hospedeiros intermediários de *S. mansoni*, *Fasciola hepatica*, *Paragonimus westermani*, *Angiostrongylus sp.* (*B. straminea*, *B. tenagophila*, *B. pfeifferi*, *Bulinus sp.*, *Lymnaea columella*, *Melanoides tuberculata*, *Achatina fulica*), entre outros (MELLO *et al.* 2010; VASCONCELLOS & SCHALL, 1986; GIOVANELLI *et al.* 1999; VASCONCELLOS & AMORIN, 2003; OLIVEIRA, 2007, entre outros). Dentre os componentes bioativos presentes no látex, a miliamina L é a mais potente, sendo até 100 vezes mais ativa que Bayluscide[®] (ZANI *et al.* 1989). Quanto às características toxicológicas apresentadas, não foram observados efeitos carcinogênicos, mutagênicos (MARSTON & HECKER, 1983), irritabilidade cutânea e ocular em coelhos, citotoxicidade (ZAMITH *et al.* 1996), embriofetotoxicidade (SOUZA *et al.* 1997) e ecotoxicidade (OLIVEIRA-FILHO & PAUMGARTTEN, 1997), nas doses indicadas para o controle de moluscos. Segundo Schall *et al.* (1992), o látex se mantém completamente ativo durante 13 dias, após este período perde gradativamente seu potencial letal até o 30º dia de coleta do produto.

Testes laboratoriais caracterizaram o efeito negativo da ação do látex de *E. milli* var. *hislopai* sobre a biologia reprodutiva de *B. glabrata*, observando os parâmetros fecundidade e fertilidade. Mello-Silva *et al.* (2007) concluíram que o contato com este produto, na concentração sub letal (CL₅₀), por um período de 24 horas, é suficiente para reduzir o processo reprodutivo dos caramujos tratados. Lima (2010) utilizando também a CL₅₀ observou que o estresse ocasionado pelo contato com o látex é mais danoso para a reprodução de moluscos que o decorrente da infecção por *S. mansoni*. Curiosamente, o látex não age sobre a embriologia de *B. glabrata* nas concentrações utilizadas para o controle dos moluscos. Schall *et al.* (1998) observaram que somente a partir 870 mg/L o látex começa a ter efeito letal sobre os ovos do molusco.

As alterações fisiológicas ocasionadas pelo látex foi objeto de estudo de Mello-Silva (2005) e Lima (2010). De acordo com os referidos autores, durante a exposição de *B. glabrata* à concentração sub letal é observada intensa redução nas reservas de glicogênio da glândula digestiva e concomitantemente, aumento no conteúdo de proteínas totais presentes na hemolinfa do molusco (MELLO-SILVA *et al.* 2006; LIMA, 2010). Em moluscos infectados por *S. mansoni* é observado um mecanismo semelhante ao anterior, entretanto, moluscos infectados são mais sensíveis ao composto e expressam, na terceira semana de infecção, os menores níveis de glicogênio na glândula digestiva e massa cefalopodia (MELLO-SILVA *et al.* 2010). El-Ansary *et al.* (2001) atribuem o efeito moluscicida de plantas a interferência na via glicolítica ocasionada por tais compostos. A redução da compatibilidade para o desenvolvimento do parasito é devido a alterações na atividade da hexoquinase, glicose fosfato isomerase e piruvato quinase, três importantes enzimas glicolíticas. É importante ressaltar que a via glicolítica é a via metabólica mais importante para caramujos infectados e é afetada tanto em caramujos expostos a compostos sintéticos quanto a naturais.

Mello-Silva *et al.* (2011) observaram que a exposição de moluscos infectados por *S. mansoni* ao látex ocasionou esgotamento das fontes alternativas de energia (proteínas totais), bem como significativa variação na concentração dos produtos nitrogenados de degradação. Segundo os autores, o aumento no nível de uréia com a diminuição dos níveis de ácido úrico reflete o distúrbio ocasionado pela intoxicação pelo látex no metabolismo do molusco, principalmente nos infectados. Devido à ação intensificada deste produto sobre moluscos infectados, admite-se que o látex de *Euphorbia milii* var. *hislopilii* é um produto promissor no combate a moluscos hospedeiros intermediários por apresentar caráter seletivo para populações de moluscos infectados.

3. CAPÍTULO 1 – EFEITO DO MOLUSCÍCIDA *Euphorbia milii* (syn. *splendens*) var. *hislopii* NO DESENVOLVIMENTO DE *Schistosoma mansoni* EM *Biomphalaria glabrata*

CAPÍTULO 1 – EFEITO DO MOLUSCICIDA *Euphorbia milii* (syn. *splendens*) var. *hislopü* NO DESENVOLVIMENTO DE *Schistosoma mansoni* EM *Biomphalaria glabrata*

RESUMO

A esquistossomose é a principal doença helmíntica humana do mundo. Atualmente, Bayluscide[®] é a principal substância moluscicida utilizada no controle da doença, entretanto, desvantagens como custo elevado, ação em organismos não-alvos e o desenvolvimento de resistência em populações tratadas são observadas. Nesse sentido, a Organização Mundial de Saúde (OMS) tem estimulado o desenvolvimento de compostos fitoterápicos e, dentre as substâncias pesquisadas, *Euphorbia milii* (syn. *splendens*) var. *hislopü* é o principal candidato a ser utilizado em campanhas de controle de larga-escala. O objetivo do presente estudo é avaliar o efeito da exposição da dose sub letal (DL₅₀) do látex de *E. milii* var. *hislopü* sobre as diferentes fases do desenvolvimento de *Schistosoma mansoni* em seu hospedeiro intermediário. Para tanto, realizamos tratamentos com caramujos não infectados e infectados com diferentes semanas de infecção (1^o a 8^o) com 10 réplicas em cada. Caramujos não expostos, infectados ou não infectados também foram testados como controle. A exposição de exemplares de *Biomphalaria glabrata* infectada e exposta ao látex causou redução significativa e/ou inibição da atividade reprodutiva dos moluscos. A sobrevivência e a eliminação de cercárias foram drasticamente reduzidas nos caramujos sob o tratamento do látex. Concluimos que a utilização da dose sub letal (DL₅₀) do látex de *E. milii* var. *hislopü* apresentou ação tóxica frente aos caramujos tratados e esta foi mais intensa nos exemplares infectados com *S. mansoni*, sendo uma importante ferramenta no controle da esquistossomose.

PALAVRAS-CHAVE: *Esquistossomose, moluscicida, controle de parasitos.*

CAPÍTULO 1 – EFFECT OF MOLLUSCICIDE *Euphorbia milli milii* (syn. *splendens*) var *hislopii* IN DEVELOPMENT OF *Schistosoma mansoni* IN *Biomphalaria glabrata*

ABSTRACT

Schistosomiasis is the major helminth human disease in the world. Currently, Bayluscide is the main chemical molluscicide used to control the disease. However, disadvantages such as high cost, action on non-target organisms and the development of resistance in treated populations are observed. In this sense, the World Health Organization (WHO) has stimulated the development of herbal compounds and, among the substances studied, *Euphorbia milli* (syn. *splendens*) var. *hislopii* is the leading candidate to be used in campaigns to control large-scale. The objective of this study is to evaluate the effect of exposure of sub-lethal dose (LD₅₀) of the *E. milli* var. *hislopii* latex on the different developmental stages of *Schistosoma mansoni* in its intermediate host. We made treatments with snails and infected with different weeks of infections (1° to 8°) with 10 replicates each. Snails exposed, infected or uninfected, were tested as controls. The exposure of *Biomphalaria glabrata* infected and exposed to latex caused a significant reduction and/or inhibition of reproductive activity of the molluscs. The survival and elimination of cercariae in the snails have been drastically reduced in the treatment of latex. We conclude that the use of sub-lethal dose (LD₅₀) of the latex of *E. milli* var. *hislopii* toxic showed front of snails treated and was more intense in the samples infected with *S. mansoni* is an important tool in the control of schistosomiasis.

KEYWORDS: *Schistosomiasis, molluscicide, control parasites.*

3.1- INTRODUÇÃO

A esquistossomose é a principal doença helmíntica humana do mundo (BERQUIST, 2005). É causada pelo trematódeo do gênero *Schistosoma*, sendo responsável por aproximadamente 240 milhões de pessoas infectadas, em 76 países distribuídos entre a Ásia, África, América do Sul e Caribe (HAMED, 2010). No Brasil, a doença não é apenas um grave problema em saúde pública, mas também um grave problema econômico, pois afeta aproximadamente seis milhões de pessoas comprometendo significativamente a capacidade produtiva dos indivíduos parasitados (KATZ & PEIXOTO, 2000). Entre os moluscos hospedeiros de *S. mansoni* no Brasil, *Biomphalaria glabrata* é considerada a de maior importância em saúde pública devido à sua ampla distribuição geográfica, capacidade de adaptação às diferentes condições ambientais e susceptibilidade à infecção pelo parasito (SOUZA & LIMA, 1990).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), o método de controle quimioterápico com Praziquantel é o mais apropriado, entretanto, a possibilidade do surgimento de resistência e a inatividade contra a reinfecção, são aspectos negativos ao uso exclusivo da droga (SINGH *et al.* 1996). Neste sentido, a OMS preconiza, para reduzir a morbidade e a transmissão da esquistossomose, a associação de Praziquantel com o emprego de compostos moluscicidas. O tratamento dos indivíduos parasitados reduz significativamente a quantidade de vermes adultos no homem, e assim, há a redução da contaminação de coleções hídricas com os ovos do parasito, o moluscicida é responsável pela redução da densidade da população planorbídea, e desse modo, menos caramujos são infectados e o número de cercárias, nos focos de transmissão da doença, é menor (WHO, 2002).

Dentre os compostos moluscicidas, especial atenção tem sido dada a Niclosamida, um sal 2'-5'-dicloro-4'-nitrosalicilânide, distribuído comercialmente como Bayluscide® (BALOCH, 2010). Esse composto apresenta efeito tóxico para moluscos em doses inferiores a 0,5 mg/L e, no Brasil, tem sido utilizado em áreas de baixa endemicidade desde a criação do Programa Especial de Controle da Esquistossomose (PECE), em 1976 (AMARAL & PEIXOTO, 1994). Contudo, Mello-Silva *et al.* (2006), relatam que a aplicação deste produto causa ação biocida em

organismos não alvos, como plantas e outros animais, além de genotoxicidade e efeitos carcinogênicos.

O alto custo de moluscidas sintéticos, juntamente com a crescente preocupação sobre o desenvolvimento de resistência e a toxicidade sobre organismos não alvos, têm atraído interesse no uso de moluscidas de origem vegetal (EL-ANSARY *et al.* 2001; MELLO-SILVA *et al.* 2006). Segundos os autores, compostos vegetais são mais baratos, biodegradáveis e, em muitos casos, podem ser utilizados em doses sub letais no controle da esquistossomose. Dentre as espécies pesquisadas, *Euphorbia milii* (syn. *splendens*) var. *hislopii*, é principal candidato a ser utilizado em campanhas de controle de larga-escala. Esse moluscida apresenta um extenso número de estudos sobre seus efeitos sobre moluscos de interesse médico e veterinário, além das possíveis ações quando aplicados em campo (MENDES *et al.* 1997; SCHALL *et al.* 1998; DE-CARVALHO *et al.* 1998; DELGADO *et al.* 2003; MELLO-SILVA *et al.* 2010), entretanto, o efeito desse composto sobre a evolução de parasitos em seus hospedeiros intermediários ainda são escassos na literatura. Neste sentido, o presente trabalho tem por objetivo avaliar o efeito da exposição da dose sub letal (DL₅₀) do látex de *E. milii* var. *hislopii* sobre as diferentes fases do desenvolvimento de *S. mansoni* no molusco hospedeiro intermediário *Biomphalaria glabrata*.

3.2 - MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1- Obtenção do látex de *Euphorbia milii* (syn. *splendens*) var. *hislopii* e determinação da concentração letal e sub letal.

As amostras do látex de *E. milii* (syn. *splendens*) var. *hislopii* foram coletadas na localidade Ilha do Governador (22° 48' 09'' S/ 43° 12' 35'' W), Rio de Janeiro, Brasil, seguindo os procedimentos de coleta descritos por Vasconcellos & Amorin (2003), onde secciona-se o caule a aproximadamente 2 centímetros abaixo do meristema apical. Para a determinação da concentração letal (CL₉₀) e sub letal (CL₅₀), primeiramente foi preparada solução aquosa a partir de 1 mL do látex *in natura*, adicionando, em balão volumétrico, água destilada até 1000 ml, obtendo assim a concentração de 1000 mg/L = µl/L, ou seja 1000 ppm (solução –mãe). Foram realizadas 7 soluções com aumento gradual da concentração do látex de *Euphorbia milii* (syn. *splendens*) var. *hislopii* (0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0 mg/l) e para cada concentração testada foram utilizados 20 exemplares de *B. glabrata*, medindo 8 -12 mm de diâmetro de concha, sendo mantidos na solução por 24 horas. Como controle, 20 moluscos foram mantidos em água destilada. Durante este período todos os moluscos estiveram em jejum. (VASCONCELLOS & AMORIM, 2003). O cálculo da concentração letal (CL₅₀) será realizado através da análise dos próbites (FINNEY, 1971).

3.2.2- Manutenção dos caramujos em laboratório e formação de grupos experimentais.

Os exemplares de *B. glabrata* (linhagem Belo Horizonte - BH), foram mantidos em laboratório com os padrões de criação descritos por Augusto *et al.* (2009), onde os caramujos são criados em aquários de polietileno de 6 litros de capacidade, com água desclorada (decantação e evaporação do cloro). A temperatura da água é mantida em 25 ± 3°C e do ambiente em 28 ± 3°C. A luminosidade é controlada em 12h de luz / 12h de escuridão. Semanalmente os aquários são limpos e os caramujos são alimentados diariamente *ad libitum* com folhas de alface (*Lactuca sativa* L).

Após a determinação da dose sub letal 180 exemplares foram divididos em 18 grupos com 10 caramujos em cada. Os caramujos foram infectados individualmente com 6 a 8 miracídios. Com o objetivo de avaliar a ação do tratamento com a DL₅₀ sobre

cada fase do desenvolvimento de *S. mansoni* em *B. glabrata* infectada, foram estipulados 8 grupos experimentais, sendo: 1- caramujos na 1^o semana de infecção exposto ao látex; 2- caramujos na 2^o semana de infecção exposto ao látex; 3- caramujos na 3^o semana de infecção exposto ao látex; 4- caramujos na 4^o semana de infecção exposto ao látex; 5- caramujos na 5^o semana de infecção exposto ao látex; 6- caramujos na 6^o semana de infecção exposto ao látex; 7- caramujos na 7^o semana de infecção exposto ao látex; 8- caramujos na 8^o semana de infecção exposto ao látex. Para cada grupo experimental, um grupo com caramujos infectados e criados sob os mesmos padrões foram mantidos em água destilada, como controle positivo, o mesmo ocorreu para caramujos não infectados e expostos; e não infectados e não expostos, sendo respectivamente controle negativo exposto e controle negativo não exposto.

Após infecção, os caramujos foram mantidos isolados por um período de 35 dias e a contagem de ovos e massas ovíferas foi realizada semanalmente. A positividade dos caramujos e a contagem de cercárias iniciaram-se após 21 dias de infecção e foi realizado até a 6^o semana de infecção. Para tanto os moluscos foram expostos individualmente com 5 mL de água desclorada, sob luz artificial (60 watts) por 1 hora. As cercárias eliminadas pelos moluscos em 0,5 ml foram distribuídas em três alíquotas em placas de vidro, fixadas com lugol e contadas com o auxílio de microscópio estereoscópico.

3.2.3- Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos através de média \pm desvio-padrão e submetidos ao teste de análise de variância (ANOVA) e ao teste t de Student ($\alpha=5\%$) (Instat, GraphPad, v.4.00, Prism, GraphPad, v.3.02, Prism inc.).

3.3- RESULTADOS

O efeito da toxicidade letal em 50% dos moluscos expostos ao extrato aquoso do látex de *E. milii* var. *hislopii* concentrou-se em 1.4 mg/l. Na figura 1 podemos observar um acentuado declínio na sobrevivência dos caramujos do grupo infectado e exposto ao tratamento a partir da segunda semana de infecção, sendo este grupo de caramujos com os menores índices de sobrevivência durante todo desenvolvimento do *S. mansoni* intra-molusco.

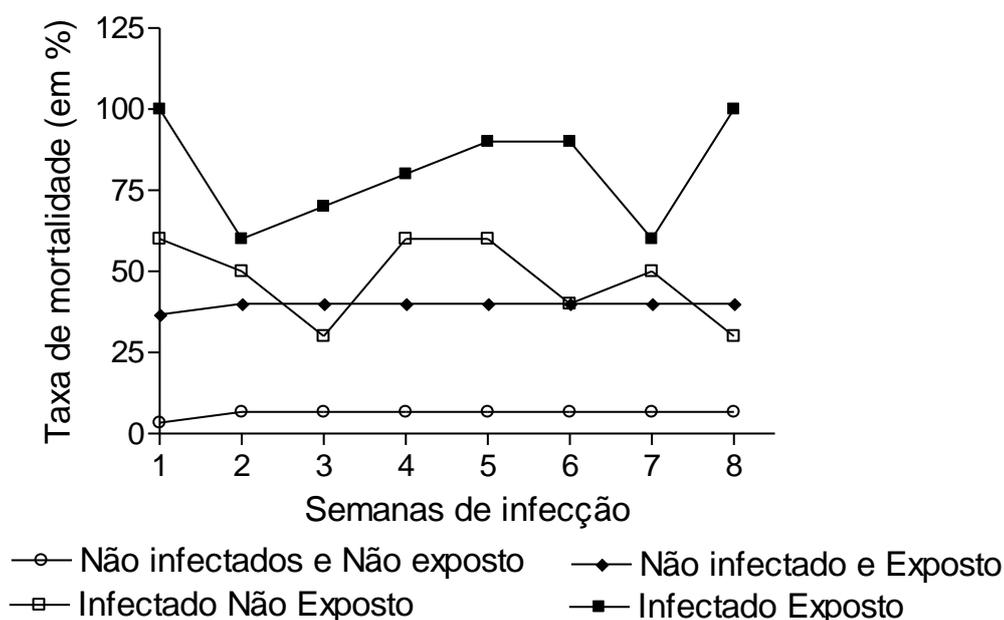


Figura 1: Efeito do tratamento com a DL₅₀ do extrato aquoso de *Euphorbia milii* (*syn. splendens*) var. *hislopii* nas diferentes semanas de infecção de *Schistosoma mansoni* na sobrevivência de *Biomphalaria glabrata* infectada em laboratório, ao final do período experimental.

Ainda no grupo infectado e exposto ao tratamento, foi observada 100% de mortalidade, nos caramujos expostos durante a primeira e oitava semana de infecção. Os caramujos não infectados e não expostos ao látex (grupo controle negativo) a taxa de sobrevivência manteve-se praticamente constante durante todo o experimento. O grupo com caramujos infectados e não expostos ao látex, a sobrevivência foi variável em todas as semanas durante o período analisado.

Os resultados da biologia reprodutiva demonstram que a infecção de *B. glabrata* pelo *S. mansoni* reduziu, de maneira mais acentuada os índices reprodutivos do que somente a exposição ao produto (Tabela1). O uso do látex sobre os caramujos adultos

foi responsável por uma redução de 14.5% na produção de ovos de *B. glabrata* durante o período experimental.

Tabela 1: Efeito do tratamento com a DL₅₀ do extrato aquoso de *Euphorbia milii* (syn. *splendens*) var. *hislopii* nas diferentes semanas de infecção de *Schistosoma mansoni* na biologia reprodutiva de *Biomphalaria glabrata* infectada em laboratório.

		Ovos / caramujo	Massa ovígera/ caramujo	Ovos/ massa ovígera
	<i>Não infectado e Não Exposto</i>	27.6±13.1 ^a	5±2.3 ^a	7.8±6.5 ^a
	<i>Não infectado Exposto</i>	23.6±14.5 ^a	4±2.3 ^{a,c}	6.2±1.8 ^a
1º semana de infecção	<i>Infect. não Exposto</i>	6.3±6.1 ^a	0.5±0.4 ^b	19.9±6.5 ^a
	<i>Infect. Exposto</i>	2.8±6.3 ^b	0.1±0.3 ^b	10±14 ^a
2º semana de infecção	<i>Infect. não Exposto</i>	6.6±6.1 ^a	0.5±0.4 ^b	11.1±5.4 ^a
	<i>Infect. Exposto</i>	1±2.4 ^b	0.06±0.1 ^b	3.6±8 ^a
3º semana de infecção	<i>Infect. não Exposto</i>	7.5±5.1 ^a	0.5±0.4 ^b	14±2.2 ^a
	<i>Infect. Exposto</i>	0.92±0.89 ^b	0.1±0.1 ^b	6.5±6.6 ^a
4º semana de infecção	<i>Infect. não Exposto</i>	6.4±3 ^a	0.5±0.3 ^b	18.2±13.2 ^a
	<i>Infect. Exposto</i>	0.0±0.0 [*]	0.0±0.0 [*]	0.0±0.0 [*]
5º semana de infecção	<i>Infect. não Exposto</i>	12±4 ^a	0.9±0.2 ^b	13.2±6.2 ^a
	<i>Infect. Exposto</i>	0.0±0.0 [*]	0.0±0.0 [*]	0.0±0.0 [*]
6º semana de infecção	<i>Infect. não Exposto</i>	13±3 ^a	1±0.1 ^b	13.6±6.2 ^a
	<i>Infect. Exposto</i>	17.16 ^a	0.9±0.2 ^b	21.8±10.2 ^a
7º semana de infecção	<i>Infect. não Exposto</i>	7.2±4.3 ^a	1.2±1.4 ^b	10.2±6.8 ^a
	<i>Infect. Exposto</i>	22.5±23.7 ^a	1.7±1.4 ^{b,c}	10.6±3.6 ^a
8º semana de infecção	<i>Infect. não Exposto</i>	28.8±2 ^a	1.5±0.7 ^b	20.8±17.9 ^a
	<i>Infect. Exposto</i>	0.0±0.0 [*]	0.0±0.0 [*]	0.0±0.0 [*]

a,b = letras diferentes demonstram diferenças significativas ($\alpha=5\%$) entre os grupos.

*= Caramujos não realizaram postura de ovos durante todo o período analisado.

Quando comparamos a ação do moluscicida sobre caramujos infectados, observamos redução na produção de ovos de até 87,7%, análise feita na comparação de caramujos expostos ao látex durante a terceira semana de desenvolvimento de *S. mansoni* intra-molusco. Entretanto, na sexta e sétima semana de infecção foi observada um aumento na produção de ovos por molusco durante o período analisado. Os caramujos que apresentavam a 3º, 4º e 8º semanas de infecção no momento da ação do

látex não realizaram posturas de ovos durante os 35 dias de observação (Tabela 1).

Os dados referentes à eliminação de cercárias por molusco observado neste estudo estão na Tabela 2. A eliminação média de cercárias observada durante os 35 dias de experimento demonstraram que o tratamento com o látex reduz a eliminação de cercárias dos caramujos tratados, sendo o grupo na 5^o semana de infecção o único a apresentar um aumento na eliminação de cercárias nos caramujos tratados.

Na primeira verificação da eliminação de cercárias após o tratamento (7 dias), todos os grupos reduziram o número de cercárias eliminadas por caramujo, sendo a 3^a (exposto= 0.4 ± 0.5 e controle = 1.1 ± 0.1) e a 7^a (exposto= 2 ± 0.16 e controle = 3.1 ± 0.006) semanas de infecção as mais afetadas pelo produto ($p < 0.001$). Após 28 dias de exposição foram observados os maiores índices de redução entre todos os grupos tratados, sendo a 1^a (controle= 3.1 ± 0.05 , exposto= 2.5 ± 0.04), 2^a (controle= 3.5 ± 0.04 , exposto= 2.7 ± 0.07) 6^a (controle= 3.2 ± 0.02 , exposto= 2.2 ± 0.1), 7^a (controle= 3.6 ± 0.07 , exposto= 1.8 ± 0.5) e 8^a (controle= 2.3 ± 0.1 , exposto= 0) semanas de infecção as mais afetadas ($p < 0.001$). A média da eliminação de cercárias por caramujo entre os indivíduos do grupo tratado e do grupo controle no decorrer da evolução do parasito no seu hospedeiro intermediário pode ser observada na Figura 2. Foi observado que a exposição ao látex foi responsável pela variação na eliminação média de caramujos entre -76% na 8^o semana de infecção a +3.2% na quinta semana de infecção e ainda, a taxa de redução é mais acentuada nos grupos expostos a partir da 6^o semana de infecção.

Tabela 2: Efeito do tratamento com a DL₅₀ do extrato aquoso de *Euphorbia milii* (*syn. splendens*) var. *hislopilii* nas diferentes semanas de infecção de *Schistosoma mansoni* na sobrevivência e na eliminação de cercárias por *Biomphalaria glabrata* infectada em laboratório. Dados em Log(x). Os números entre parêntese são referentes ao número de caramujos vivos e o símbolo (-) representa a ausência de caramujos.

Dias pós exposição/ semana de infecção	1° semana de infecção		2° semana de infecção		3° semana de infecção		4° semana de infecção		5° semana de infecção		6° semana de infecção		7° semana de infecção		8° semana de infecção	
	Exposto / Controle		Exposto/ Controle		Exposto/ Controle		Exposto/ Controle		Exposto/ Controle		Exposto/ Controle		Exposto/ Controle		Exposto/ Controle	
7 dias	0.0±0.0 (10)	0.0±0.0 (04)	0.0±0.0 (07)	0.0±0.0 (10)	0.4±0.5 (10)	1.1±0.1*** (10)	2.8±0.4 (08)	3.1±0.5 (10)	2.9±0.004 (02)	2.9±0.04 (09)	2.4±0.006 (06)	2.9±0.01 (10)	2.0±0.16 (06)	3.1±0.006*** (10)	3.1±0.05 (02)	3.3±0.02 (09)
14 dias	2.6±0.01 (03)	1.3±0.1*** (07)	1.5±0.2 (07)	2.3±0.06 (10)	1.8±0.1 (06)	2.3±0.06 (09)	3.1±0.08 (03)	3.9±0.01 (10)	3.3±0.0 (01)	3.5±0.005 (08)	1.7±0.5 (05)	2.6±0.05** (10)	0.8±0.7 (05)	2.6±0.01*** (07)	- (0)	2.5±0.09 (09)
21 dias	0.0±0.0 (01)	1.1±0.0 (05)	2.3±0.2 (04)	1.4±0.3 (05)	1.1±1.5 (04)	3.3±0.004*** (08)	2.7±0.01 (03)	3±0.01 (08)	3.3±0.0 (01)	3±0.01 (08)	2.5±0.05 (04)	3.2±0.01 (10)	1.7±0.3 (05)	3±0.05 (07)	- (0)	3.2±0.03 (09)
28 dias	2.5±0.0 (01)	3.1±0.05*** (05)	2.7±0.07 (04)	3.5±0.04*** (05)	3.2±0.05 (04)	3.2±0.07 (08)	3.3±0.3 (02)	3.4±0.02 (07)	3.3±0.0 (01)	3.5±0.01 (07)	2.2±0.0 (01)	3.2±0.02*** (06)	1.8±0.5 (04)	3.6±0.07*** (07)	- (0)	2.3±0.1 (07)
35 dias	- (0)	2.8±0.01 (04)	2.7±0.2 (04)	2.4±0.5 (05)	3.7±0.002 (03)	3.8±0.03 (07)	3.1±0.2 (02)	3.2±0.08 (04)	2.9±0.0 (01)	2.3±0.04 (04)	0.0±0.0 (01)	3.6±0.01*** (06)	1.2±1.3 (04)	3.5±0.08*** (05)	- (0)	1.6±0.1 (07)
TOTAL	5.1	8.3	9.2	9.6	10.2	13.7	15	16.6	15.7	15.2	8.8	15.6	7.5	15.8	3.1	12.9

*p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001

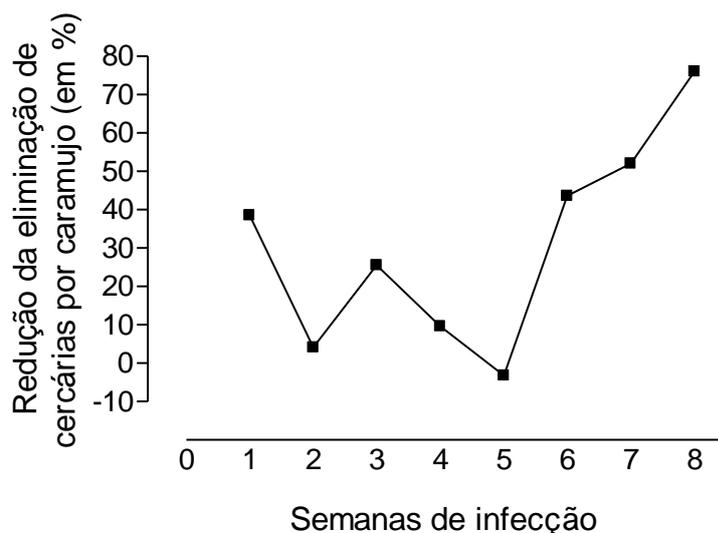


Figura 2- Efeito do tratamento com a DL₅₀ do extrato aquoso de *Euphorbia milii* (syn. *splendens*) var. *hislopii* na eliminação de cercárias de *Schistosoma mansoni* em diferentes semanas de infecção. Resultados do grupo tratado com relação ao seu grupo controle (em porcentagem).

A tabela 3 contém dos dados do efeito global do tratamento com a DL50 do látex de *E. milii* var. *hislopii* sobre uma população de 80 moluscos infectados com *S. mansoni* durante 35 dias. O estudo longitudinal do ritmo circadiano na emergência de cercária de *S. mansoni* por *B. glabrata* no grupo controle foi possível obter, em condições de laboratório, 613.487 cercárias eliminadas por 80 caramujos, em diferentes semanas de infecção, durante um período de 35 dias.

	Controle N° de cercárias	Exposto N° de cercárias
1° semana de infecção	239.157	35.705
2° semanas de infecção	12.410	11.430
3° semanas de infecção	45.130	30.680
4° semanas de infecção	87.090	27.900
5° semanas de infecção	57.130	7.300
6° semanas de infecção	63.920	6.372
7° semanas de infecção	79.290	11.040
8° semanas de infecção	29.360	2.930
Total	613.487	133.357

No grupo submetido ao tratamento, foram eliminadas 133.357 cercárias durante o mesmo período, desse modo, o tratamento com esse produto, sob concentração

específica, ocasiona em condições laboratoriais a redução de 78,26% de cercárias eliminadas nos recursos hídricos. A redução global ocasionada pelo contato de 24h com a DL₅₀ do látex, em cada semana de desenvolvimento de *S. mansoni*, pode ser observado na figura 3.

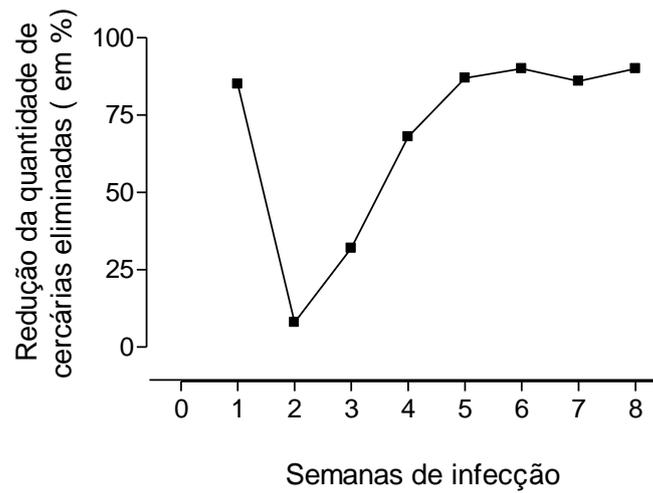


Figura 3- Efeito global do tratamento com a DL₅₀ do extrato aquoso de *Euphorbia milii* (*syn. splendens*) var. *hislopii* na eliminação de cercárias de *Schistosoma mansoni* em diferentes semanas de infecção. Resultados do grupo tratado com relação ao seu grupo controle (em porcentagem).

3.4- DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que o moluscicida *E. milli* (syn *splendens*) var. *hislopii* pode ser eficiente no controle do molusco *B. glabrata*. O comportamento dos moluscos infectados e expostos ao látex divergiu significativamente na sobrevivência, biologia reprodutiva e eliminação de cercárias e desse modo, nossos resultados estão de acordo com estudos que indicam ser a dose sub-letal deste, e de outros produtos, uma importante ferramenta no controle da esquistossomose e de outras enfermidades de importância médica e veterinária (MELLO-SILVA *et al.* 2007, 2010, 2011; BAKRY, 2009). Estudos sobre a influência de produtos tóxicos sobre o ritmo circadiano de *S. mansoni* são importantes para melhor compreender a dinâmica da transmissão da esquistossomose durante ações de controle da malacofauna em áreas endêmicas para a esquistossomose.

Atualmente, os metabólitos secundários de plantas da família Euphorbiaceae apresentam maior atividade moluscicida que qualquer composto sintético (SINGH, AGARWAL, 1984), sendo o extrato aquoso de *E. milli* o composto mais efetivo contra moluscos hospedeiros intermediários (VASCONCELLOS & SCHALL, 1986; MENDES *et al.* 1997; SCHALL *et al.* 1998; MELLO-SILVA *et al.* 2011).

A avaliação do efeito letal (DL₉₀) de *E. milii* (syn *splendens*) var. *hislopii* sobre *Lymnaea columella* (Say, 1817) variou de 0,55 a 1,51 mg/l nas quatro estações do ano (VASCONCELLOS & AMORIN, 2003). Para exemplares de *B. glabrata*, Mello-Silva (2005), observou a DL₉₀ em 2,3 mg/l e DL₅₀ em 1,04 mg/l, entretanto Lima (2010) utilizando exemplares do mesmo cultivo determinou como dose sub-letal (DL₅₀) de 0,7 mg/l. O presente estudo determinou como dose letal (DL₉₀) 3,2 mg/l e como DL₅₀ 1,4 mg/l para espécies coletados na Ilha do Governador (22° 48' 09'' S/ 43° 12' 35'' W), Rio de Janeiro, Brasil. Especificidades genéticas e fatores ambientais podem alterar a concentração de L-miliaminas, saponinas, taninos e outros fatores solúveis importantes na atividade moluscicida deste produto. Outros fatores como temperatura e pH também podem afetar a ação deste moluscicida (VASCONCELLOS *et al.* 2003).

A redução nas taxas de sobrevivência dos moluscos frente ao desenvolvimento larval intra-molusco de *S. mansoni*, bem como a ação da dose sub-letal do látex de *E. milli* var. *hislopii* sobre caramujos adultos, por um período de 24 horas, foram avaliados

por Mello-Silva *et al.* (2011), sendo proposta uma possível ação seletiva deste produto à caramujos infectados com o referido trematódeo. Araújo *et al.* (2002) ao expor exemplares de *L. columella* a doses sub-letais de *E. splendens* var. *hislopii* observaram lesões necróticas e depósito intersticial na glândula digestiva (células digestivas e de Lime) de moluscos submetidos ao tratamento por 24 horas. Neste estudo, os efeitos do látex sobre moluscos não infectados (controle positivos) foram deletérios em todos os parâmetros reprodutivos quando comparado aos moluscos não infectados e não expostos (controle negativo). Os resultados encontrados entre estes dois grupos corroboram com os obtidos por Mello-Silva *et al.* (2007), onde a exposição a dose sub letal de *E. milli* (syn *splendens*) var. *hislopii* também reduziu a postura de ovos de caramujos não infectados.

A atividade reprodutiva dos caramujos infectados, expostos ou não ao produto, variou intensamente ao longo do desenvolvimento de *S. mansoni* intra-molusco. Foi observado um comportamento de redução na produção de ovos dependente do desenvolvimento do parasito no molusco, onde na primeira semana de infecção foi observado um declínio de 55,6%, na segunda semana foi observada redução de 84,8%, na terceira de 87,7% e se tornando completamente ausente na quarta, quinta e oitava semanas de infecção. A redução da atividade reprodutiva de caramujos infectados com larvas de trematódeos é decorrente de mudanças metabólicas nos estoques de glicose hemolinfática e glicogênio tecidual (MELLO-SILVA *et al.* 2010). Durante o desenvolvimento do parasito na glândula digestiva (esporocisto primário → esporocisto secundário) altos níveis de glicose hemolinfática são recrutados, sendo observado o aumento da atividade catalítica nos sítios de estoques de glicogênio. Mello-Silva *et al.* (2010) ao comparar o metabolismo de carboidratos entre caramujos infectados ou não por *S. mansoni* e expostos ao látex de *E. splendens* var. *hislopii*, observou que em caramujos infectados e expostos ao moluscicida a redução nos níveis de glicose na hemolinfa ocorre logo no primeiro dia após a exposição e do glicogênio na glândula digestiva após 1 semana de exposição.

Curiosamente, quando caramujos hospedeiros intermediários com 6 ou 7 semanas de infecção foram expostos a dose sub letal do látex, foi observado um aumento na produção de ovos quando comparados com caramujos não expostos. A exposição de moluscos frente a fatores de estresse pode desencadear um comportamento

evolutivo denominado compensação reprodutiva. Comportamentos compensatórios similares foram observados por Minchella (1985) ao estudar a infecção de *S. mansoni* em *B. glabrata*. No presente estudo podemos observar que tal comportamento, em moluscos *B. glabrata* infectado por *S. mansoni* e exposto ao moluscicida foi dependente do desenvolvimento do parasito intra-molusco. Lima (2010) comparou as alterações fisiológicas em caramujos *B. glabrata* expostas a três tipos de estresse: 1- Infecção de caramujos com 1 dia de infecção por *S. mansoni*, 2- Exposição à DL₅₀ de *E. splendens* var. *hislopii* e 3- Exposição de caramujos com 1 dia de infecção por *S. mansoni* à DL₅₀ de *E. splendens* var. *hislopii*. Dentre as alterações observadas, foi possível constatar que o látex foi o responsável pela maior redução na atividade reprodutiva dos moluscos quando comparado com a infecção e que a associação desses dois fatores de estresse reduziu em 80% quando comparados com o grupo controle.

Os efeitos na eliminação de formas larvares conseqüentes da exposição de moluscos infectados são escassos na literatura (BARKY, 2009; EL-ANSARY *et al.* 2001). Sharat El-Din *et al.* (2001), ao expor caramujos *B. alexandrina* a doses sub letais do moluscicida *Zygophyllum simplex* observaram um comportamento similar aos do presente estudo na redução de cercárias eliminadas por caramujo. O processo de infecção de trematódeos em moluscos hospedeiros intermediários desencadeiam alterações nas vias metabólicas conseqüente da captura de reservas enérgicas do hospedeiro pelo parasito (BECKER, 1980). A associação da exposição a moléculas tóxicas associada ao início do desenvolvimento de *S. mansoni* em *B. glabrata* elevam a atividade glicogenólica dos tecidos de reserva (massa cefalopodal e glândula digestiva) (LIMA, 2010). No intuito de manter a homeostasia frente à infecção, há o aumento da atividade catalítica nas vias glicídicas e protéicas, com conseqüente alteração nos níveis de glicose, glicogênio e de produtos nitrogenados de degradação, resultando na mudança do padrão de excreção de moluscos limnicos de ureotélicos para uricotélico (LIMA, 2010).

3.5- CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que o látex bruto de *E. milii* var. *hislopii*, mesmo em doses sub letais, é uma importante ferramenta para o controle da esquistossomose, pois reduziu em aproximadamente 80% a quantidade de cercárias eliminadas por todos os caramujos durante o período estudado e considerando os parâmetros analisados (sobrevivência, atividade reprodutiva e quantidade de cercárias eliminadas) demonstrou ser mais tóxico à moluscos infectados, independente da semana de infecção, corroborando com a hipótese de ação seletiva deste produto.

3.6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, S.; PILE, E.A.M.; SÃO LUIZ, J.B.; SANTOS, J.A.A.; VASCONCELLOS, M. Alterações histológicas em *Lymnaea columella* provocadas pelo látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopii*. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.** v. 39, p. 157-159, 2002.

AUGUSTO, R.C.; MAGALHÃES A.C.S.; NASCIMENTO A.C.; DORNELLAS T.C.B; CORREA E.E.; MELLO-SILVA, C.C.C. 2009. Fatores ambientais favoráveis a manutenção de populações de *Biomphalaria glabrata* (linhagem BH) em laboratório para fins de pesquisa. In: *9º Congr. De Ecol. Do Brasil*. Anais. P. 1524, São Lourenço.

BAKRY, F.A. Use of some plant extracts to control *Biomphalaria alexandrina* snails with emphasis on some biological effects. **W. Appl. Scien. J.** v. 10, p. 1335-1345, 2009.

BALOGH, IB; BALOGH, MK; BALOGH, AK. Schistosomiasis suppressing deoxyphorbol esters from *Euphorbia caudifolia* L. latex. **Plant Med**, v. 76, p. 809-814. 2010.

BARBOSA, C.S.; FAVRE, T.C.; AMARAL, R.S.; PIERI, O.S. Epidemiologia e controle da esquistossomose mansoni. In: Carvalho, OS; Coelho, PMZ; Lenzi, HL. **Schistosoma mansoni: Uma visão multidisciplinar**. 1ºed. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, p. 966-1008, 2008.

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

BERGQUIST, N.R.; LEONARDO, L.R.; MITCHELL, G.F. Vaccine-linked chemotherapy: can schistosomiasis control benefit from an integrated approach? **Trends Parasitol.** v.21, p. 112-117, 2005.

DE-CARVALHO, R.R., MALDONADO JR., A., OLIVEIRA-FILHO, E.C., RIBEIRO, A.C., PAUMGARTTEN, F.J.R., REY, L. Effects of *Euphorbia milii* látex on *Schistosoma mansoni* eggs, Miracidia and Cercariae. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 93, p. 235–237. 1998.

DELGADO, I.F., DE-CARVALHO, R.R., DE-OLIVEIRA, A.C.A.X., KURIYAMA, S.N., OLIVEIRA-FILHO, E.C., SOUZA, C.A.M., PAUMGARTTEN, F.J.R. Absence of tumor promoting activity of *Euphorbia milii* latex on the mouse back skin. **Toxicol. Lett.** v. 145, p. 175–180. 2003.

EL-ANSARY, A.; MOHAMED, S.M.; MOHAMED, A.M. Induced changes in energy metabolism of *Biomphalaria alexandrina* snails using two potent plant molluscicides. **Bull. NRC. Egypt.** v. 26. p. 425-439. 2001.

FINNEY, D. J. **Probit Analysis**. 3rd ed., Cambridge University Press, New Delhi, 333pp, 1971.

HAMED, M.A. Strategic control of schistosome intermediate host. **Asian J. of Epidem.** v.3, n.3, p.123-140, 2010.

KATZ, N; PEIXOTO, S.V. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansônica no Brasil. **Rev da Soc Bras de Med Tropical**, vol.33. p. 303-308. 2000.

LIMA, M.G. *Análise fisiológica da ação do látex de **Euphorbia splendens** var. **hislopii** N.E.B (Euphorbiaceae) sobre **Biomphalaria glabrata** Say, 1818 (Pulmonata, Planorbidae) infectada por **Schistosoma mansoni** Sambom, 1907 (Trematoda, Schistosomatidae), associada ao tempo de degradação do látex.* Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2010.

MELLO-SILVA, C.C. VILAR, M.M., VASCONCELLOS, M.C., PINHEIRO, J., RODRIGUES, M.L.A. “Physiological changes in *Biomphalaria glabrata* say, 1818 (Pulmonata: Planorbidae) caused by sub-lethal concentrations of the latex of *Euphorbia splendens* var. *hislopii* N.E.B (Euphorbiaceae)”. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** v.101, pp. 3-8. 2006.

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. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 105, p. 492-495, 2010.

MELLO-SILVA, C.C.; VILAR, M.M.; BEZERRA, J.C.B.; BVASCONCELLOS, M.C.; PINHEIRO, J.; RODRIGUES, M.L.A. Reproductive activity alterations on the *Biomphalaria glabrata* exposed to *Euphorbia splendens* var. *hislopii* latex. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. v. 102. p. 000-000. 2007.

MENDES, N.M.; VASCONCELLOS, M.C.; BAPTISTA, D.F.; ROCHA, R.S.; SCHALL, V.T. Evaluation of the molluscicidal properties of *Euphorbia splendens* var. *hislopii* (N.E.B.) latex. Experimental test in an endemic area in the State of Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.92, 719–724, 1997.

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

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

SHARAF EL-DIN, A.T.; BAKRY, F.A.; TANTAWY, A. Molluscicidal activity of *Zygophyllum simplex* (Family; Zygophyllaceae) against *Biomphalaria alexandrina* and *Bulinus truncatus*, **Egyptian J. Aqua. Biol. Fisheries**.v. 4.p. 131–143. 2001.

SINGH, A; SING, DK; MISHRA, TN; AGARWAL, RA. Molluscicides of plant origin. **Biol. Agric. Hortic**, v.13, p. 205-252.1996

SINGH, D.K.; AGARWAL, R.A. Correlation of the anti-cholinesterase and molluscicidal activity of the latex of *Euphorbia royleana*. **J. Nat. Prod**. v. 47, p. 702–705, 1984

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

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

hepatica Linnaeus, 1758 (Trematoda: Fasciolidae). 1- Test in laboratory. **Mem Inst Oswaldo Cruz** v. 98, p. 557-563, 2003.

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

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Report and control of schistosomiasis and the soil-transmitted helminthiasis*. Geneva: World Health Organization, 2002.

4. CAPÍTULO 2 - CONTROLE DA DINÂMICA PARASITÁRIA DE *Schistosoma mansoni* (TREMATODA) EM *Biomphalaria glabrata* (PLANORBIDAE) ATRAVÉS DO TRATAMENTO DE OVOS E MIRACÍDIOS COM *Euphorbia milii* var. *hislopii* (EUPHORBIACEAE)

CAPÍTULO 2 - CONTROLE DA DINÂMICA PARASITÁRIA DE *Schistosoma mansoni* (TREMATODA) EM *Biomphalaria glabrata* (PLANORBIDAE) ATRAVÉS DO TRATAMENTO DE OVOS E MIRACÍDIOS COM *Euphorbia milii* var. *hislopii* (EUPHORBIACEAE)

RESUMO

O látex de *Euphorbia milii* var. *hislopii* vem sendo utilizado experimentalmente no controle de moluscos de importância médico-veterinária e pode se tornar promissor no controle em larga-escala. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da exposição da dose subletal (DL₅₀) do látex sobre ovos e miracídios durante a infecção experimental de *Schistosoma mansoni* em *Biomphalaria glabrata*. Foram realizados quatro tratamentos com 30 réplicas cada, 3 deles utilizando o extrato aquoso do látex na dose subletal e 01 utilizando água destilada como controle. Os tratamentos foram: 1- controle; 2- eclosão em água destilada e infecção na presença da dose sub letal do látex; 3- eclosão na presença da dose sub letal do látex e infecção em água destilada; 4- eclosão e infecção na presença da dose sub letal do látex. A sobrevivência dos moluscos do grupo controle foi 45,3% superior ao tratamento 4 e 27,3% ao tratamento 3. O tratamento com o látex elevou a atividade reprodutiva de *B. glabrata* nos parâmetros: ovos por molusco, massa ovígera por molusco e ovos por massa ovígera nos grupos tratados quando comparados ao grupo controle. A eliminação de cercárias por caramujo apresentou redução significativa entre os tratamentos 3 e 4 em comparação com o grupo controle na terceira e quarta semana de infecção. A dose sub-letal (DL₅₀) do látex de *E. milii* apresentou ação tóxica para ovos e miracídios afetando o processo de infecção, podendo ser utilizada como importante ferramenta no controle da dinâmica parasitária de *S. mansoni*.

PALAVRAS-CHAVE: *Esquistossomose, dinâmica parasitária, Euphorbia milii*

CHAPTER 2 – CONTROL OF PARASITIC DYNAMICS OF *Schistosoma mansoni* (TREMATODA) IN *Biomphalaria glabrata* (PLANORBIDAE) BY TREATMENT OF EGGS AND MIRACIDIA WITH *Euphorbia milli* var. *hislopilii* (EUPHORBIACEAE)

ABSTRACT

The *Euphorbia milii* (syn. *splendens*) var. *hislopilii* latex has been used experimentally in control of molluscs of medical veterinary importance and it could have promising implications for large-scale control. The objective of this study was to evaluate the effect of the exposure of a sub-lethal dose (LD₅₀) of latex on eggs and miracidia during experimental infection of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*. Four treatments were performed with 30 replicates each, three of them using the aqueous extract of the latex in the sub-lethal dose and one using distilled water as control. The treatments were: 1 - control, 2 - hatching in distilled water and infection in the presence of a sub-lethal dose of latex, 3 - hatching in the presence of a sub-lethal dose of latex and infection in distilled water, 4 - hatching and infection in the presence of a sub-lethal dose of latex. Survival of snails in the control group was 45.3% higher than in treatment 4 and 27.3% higher than treatment 3. Treatment with latex increased the reproductive activity of *B. glabrata* in the following parameters: eggs per mollusc, egg masses per mollusc and eggs per egg masses in the treated groups when compared to the control group. The elimination of cercariae per snail decreased significantly in treatments 3 and 4 compared with the control group in the third and fourth weeks of infection. The sub-lethal dose (LD₅₀) of the *E. milii* latex showed toxic effects on eggs and miracidia, affecting the infection process, and can be used as an important tool in controlling the parasitic dynamics of *S. mansoni*.

KEYWORDS: Schistosomiasis, parasitic dynamics, *Euphorbia milii*

4.1- INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma importante infecção parasitária, encontrada em 76 países da região tropical e subtropical ao redor do mundo. Essa parasitose é a principal doença de veiculação hídrica do mundo (STEINMANN *et al.* 2006), acometendo principalmente a população humana, porém animais domésticos, selvagens e de produção podem ser encontrados naturalmente infectados (MALDONADO Jr. *et al.* 2006; MODENA *et al.* 2008). Apesar de terem sido alcançados progressos substanciais nos programas de controle no Brasil, China e Egito (ENGELS *et al.* 2002; UTZINGER *et al.* 2005; STOTHARD *et al.* 2009), são observadas novas áreas de ocorrência da doença em todo mundo. Fatores como grandes barragens, desenvolvimento de sistemas de irrigação e o aquecimento global, podem agravar ainda mais a transmissão da esquistossomose (LI *et al.* 2007; ZHOU *et al.* 2008).

Para o controle da transmissão da esquistossomose, os estágios ovo, miracídio, cercária e caramujo são peças-chave no controle da dinâmica parasitária, pois estão sujeitos a compostos tóxicos dissolvidos no ambiente hídrico. Nesse sentido, o uso de substâncias tóxicas é uma importante estratégia para o controle da esquistossomose em curto prazo (GIOVANELLI *et al.* 2001; MELLO-SILVA *et al.* 2006). Dentre os compostos avaliados quanto sua atividade tóxica em moluscos, plantas da família Euphorbiaceae demonstraram alta atividade moluscicida quando comparadas a moluscicidas sintéticos (SINGH & AGARWAL, 1984).

Devido as características fitoquímicas apresentadas, o látex, liofilizado ou *in natura*, de *Euphorbia milii* var. *hislopii* é uma alternativa promissora para a eliminação dos moluscos hospedeiros em programas de controle (VASCONCELLOS & SCHALL, 1986; MENDES *et al.* 1997). Pesquisas anteriores caracterizaram a elevada toxicidade desse composto para moluscos dos gêneros *Biomphalaria* e *Lymnaea*, além de verificar a fotodegradabilidade e a estabilidade geográfica e sazonal desse composto (SCHALL *et al.* 1992). Estudos complementares verificaram a segurança da aplicação deste produto em campo, e caracterizaram a ausência de efeitos carcinogênico, mutagênico, embriotóxico, teratogênico em aves e mamíferos nas concentrações recomendadas (MARSTON & HECKER, 1983; SOUZA *et al.* 1997; OLIVEIRA-FILHO *et al.* 1999; 2010).

Schall *et al.* (2001), utilizando o látex em região endêmica de Minas Gerais, Brasil, interromperam o ciclo de *Schistosoma mansoni* através da eliminação de *B. glabrata* do ambiente por um período de 14 meses. Barky & Mohamed (2011), observaram relação positiva entre o tempo de exposição e a mortalidade de miracídios e cercárias, utilizando doses sub letais. Entretanto, De-Carvalho *et al.* (1998), ao expor ovos, miracídios e cercárias a doses de 10 a 100 mg/L, concluíram que o látex não teve efeito tóxico sobre as formas de *S. mansoni*.

Embora seja notória a ação moluscicida do látex de *E. milli*, trabalhos que avaliem sua ação sobre as formas livres ovo e miracídio na dinâmica parasitária são escassos na literatura. O presente trabalho tem o objetivo de avaliar o efeito da exposição da dose sub letal (DL₅₀) do látex de *E. milii* var. *hislopii* sobre as formas evolutivas ovo e miracídio no desenvolvimento do ciclo de *S. mansoni* em *B. glabrata*.

4.2 - MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1- Determinação da concentração letal e sub letal.

Idem ao item 3.2.1

4.2.2.1- Desenho experimental

Os exemplares de *B. glabrata* (linhagem Belo Horizonte - BH) utilizados neste experimento foram obtidos do moluscário do Laboratório de Esquistossomose Experimental (LEE) do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, RJ. Após a concentração dos ovos de *S. mansoni* através da técnica de sedimentação natural (LUTZ, 1919), os ovos foram expostos à luz de 60 watts por uma hora para a eclosão dos miracídios. Para a infecção, os moluscos com 8-12 mm, foram mantidos em contato com 6 a 8 miracídios por uma hora, em placas de 24 poços da marca COSTAR®.

Com a DL_{50} determinada, foram simuladas três situações de contato entre ovos e miracídios com o látex no momento da aplicação a campo: 1- controle (ovos e miracídios foram mantidos e processados em água destilada durante todo o processo de infecção), 2-eclosão em água destilada e infecção na presença da dose sub letal do látex; 3- eclosão na presença da dose sub letal do látex e infecção em água destilada; 4- eclosão e infecção na presença da dose sub letal do látex. Todos os grupos foram compostos por 30 caramujos. Após infecção, os caramujos foram mantidos individualmente em becker de 50 ml com água destilada e os parâmetros reprodutivos anotados semanalmente. A contagem de cercárias iniciou-se após 21 dias de infecção e foi realizada durante quatro semanas. A quantificação de cercárias eliminadas por caramujo foi realizada através de exposição semanal à luz artificial (60 watts) por uma hora, foram coletadas cercárias em alíquotas de 10% (0,5 ml) da amostra total (5ml), coradas e fixadas com lugol, e os resultados anotados em planilhas específicas.

4.2.3- Análise estatística.

Os resultados da biologia reprodutiva e a quantidade de cercárias eliminadas por caramujo *B. glabrata* foram expressos através de média \pm desvio-padrão e analisados pelo teste de análise de variância (ANOVA) ($\alpha=5\%$) (Instat, GraphPad, v.4.00, Prism, GraphPad, v.3.02, Prism inc.).

4.3- RESULTADOS

A dose letal (DL_{90}) e a dose sub letal (DL_{50}) encontrada no presente estudo foi de 2,7 mg/L e 1,4mg/L ($x^2 = 5,7$; $x^2 \text{ tab} = 14,07$; g.l. = 7) respectivamente. A sobrevivência dos moluscos do grupo controle (sem contato com o látex) foi 45,3% superior ao final do experimento da observada no tratamento 4, onde o processo de eclosão e infecção em laboratório ocorreu em contato com a dose sub letal (DL_{50}) do látex de *E. milii* var. *hislopii* (Figura 1).

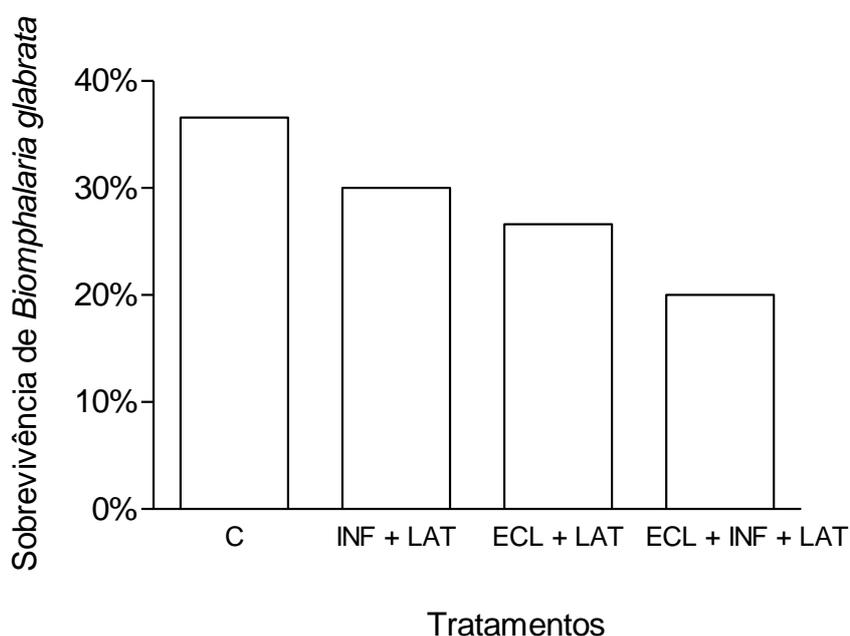


Figura 1: Efeito do tratamento com a DL_{50} do extrato aquoso de *Euphorbia milii* (*syn. splendens*) var. *hislopii* na eclosão e/ou infecção de miracídeos de *Schistosoma mansoni* na sobrevivência de *Biomphalaria glabrata* infectada em laboratório. C = grupo controle, INF+LAT = infecção na presença do látex, ECL+LAT = eclosão na presença do látex e ECL+INF+LAT = eclosão e infecção do miracídeos no molusco na presença do látex

A eclosão dos ovos do parasito na presença deste produto na mesma concentração (tratamento 3) acarretou em diminuição de 27,3% na sobrevivência de *B. glabrata* até 54 dias após a infecção (Figura 1). A taxa de infecção de caramujos *B. glabrata* no início do período patente (21º de infecção) foi 30% superior no grupo controle quando comparado ao tratamento 4, grupo onde a eclosão e a infecção ocorreram em contato com o látex (Figura 2).

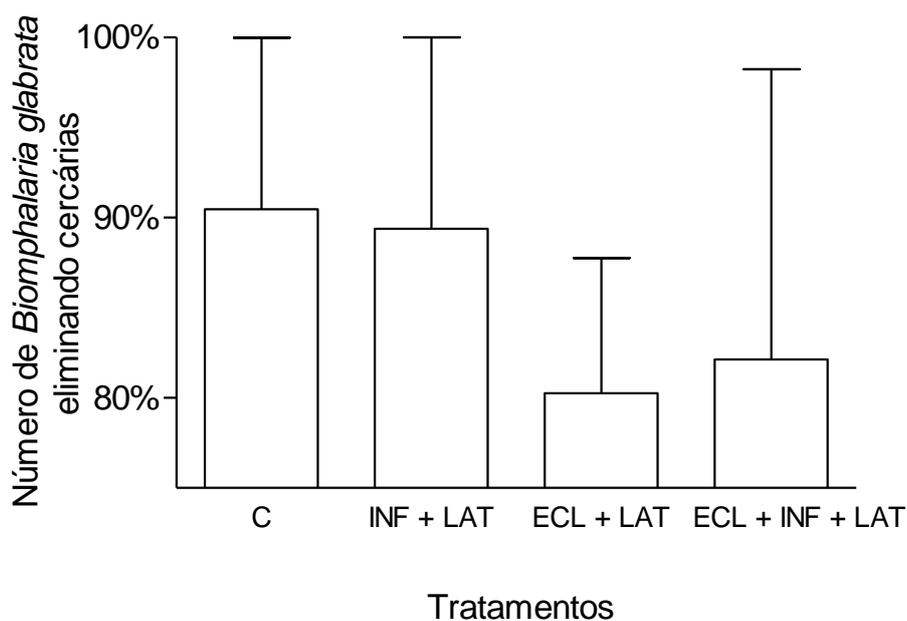


Figura 2: Efeito do tratamento com a DI_{50} do extrato aquoso de *Euphorbia milii* (*syn. splendens*) var. *hislopii* na eclosão e/ou infecção de miracídios de *Schistosoma mansoni* na positividade *Biomphalaria glabrata* infectada em laboratório. C = grupo controle, INF+LAT = infecção na presença do látex, ECL+LAT = eclosão na presença do látex e ECL+INF+LAT = eclosão e infecção do miracídios no molusco na presença do látex

Alterações na atividade reprodutiva de *B. glabrata* infectada com ovos e miracídios de *S. mansoni* tratados com a DL_{50} do extrato aquoso de *E. milii* var. *hislopii* foram observadas durante os 54 dias de experimento. O tratamento com o látex ocasionou um aumento na média de produção de ovos e massa ovígera por molusco e ovos por massa ovígera nos grupos tratados em comparação com o grupo controle (Tabela 1).

Tabela 1: Efeito do tratamento com a DI_{50} do extrato aquoso de *Euphorbia milii* (*syn. splendens*) var. *hislopii* na eclosão e/ou infecção de miracídios de *Schistosoma mansoni* na biologia reprodutiva de *Biomphalaria glabrata* infectada em laboratório

GRUPOS	Ovos / caramujo	Massa ovígera/ caramujo	Ovos/ massa ovígera
1- Controle	6.1 ± 1^a	0.77 ± 1^a	4.9 ± 3^a
2- Infecção + látex	6.4 ± 5.3^a	0.77 ± 0.7^a	9.1 ± 3.1^a
3- Eclosão + látex	9 ± 4.7^a	0.9 ± 0.8^a	11.6 ± 4.2^a
4- Eclosão + infecção + látex	8 ± 7.8^a	0.8 ± 1.1^a	8.4 ± 2.7^a

Quanto ao potencial de transmissibilidade (número de cercárias eliminadas/caramujo), observou-se uma redução entre todos os tratamentos e o grupo controle durante o tempo analisado (Tabela 2). Estes resultados demonstram que a eclosão dos miracídios na presença do látex é responsável pelos efeitos mais danosos que quando o contato com o látex se dá no momento da infecção de *S. mansoni* em seu hospedeiro intermediário. Os caramujos que foram infectados na presença da dose subletal (DL₅₀) reduziram o número de cercárias eliminadas em 7,3% em relação ao grupo controle (Tabela 2).

Tabela 2. Efeito do tratamento com a DL₅₀ do extrato aquoso de *Euphorbia milii* (*syn. splendens*) var. *hislopii* sobre a eliminação de cercárias de *Biomphalaria glabrata* infectada experimentalmente com *Schistosoma mansoni*. Dados em média e desvio-padrão. Resultados em Log₁₀(x).a,b,c = Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre as médias ($\alpha = 5\%$)

GRUPOS	3º semana de infecção	4º semana de infecção	5º semana de infecção	6º semana de infecção
1- Controle	1.59±1.17 ^a	3.33±0.21 ^a	3.37±0.2 ^a	3.2±0.09 ^a
2- Infecção + látex	1.74±0.96 ^a	2.82±0.38 ^{a,b}	3.27±0.15 ^a	3.11±0.5 ^a
3- Eclosão + látex	1.34±0.97 ^a	1.87±1.08 ^c	2.77±0.3 ^b	2.86±0.42 ^a
4- Eclosão + infecção + látex	1.11±0.95 ^a	1.98±0.77 ^{b,c}	2.74±0.51 ^b	3.06±0.29 ^a

A influência do látex nos eventos eclosão do miracídio (tratamento 3) e eclosão-infecção (tratamento 4) foram os mais críticos para o desenvolvimento do ciclo de *S. mansoni*, sendo a eliminação de cercárias reduzida em 55,9% e 69,6%, respectivamente (Tabela 2). A análise da regressão polinomial demonstrou uma relação negativa entre a eliminação de cercária por caramujo e o tratamento durante o período analisado (Figura 3).

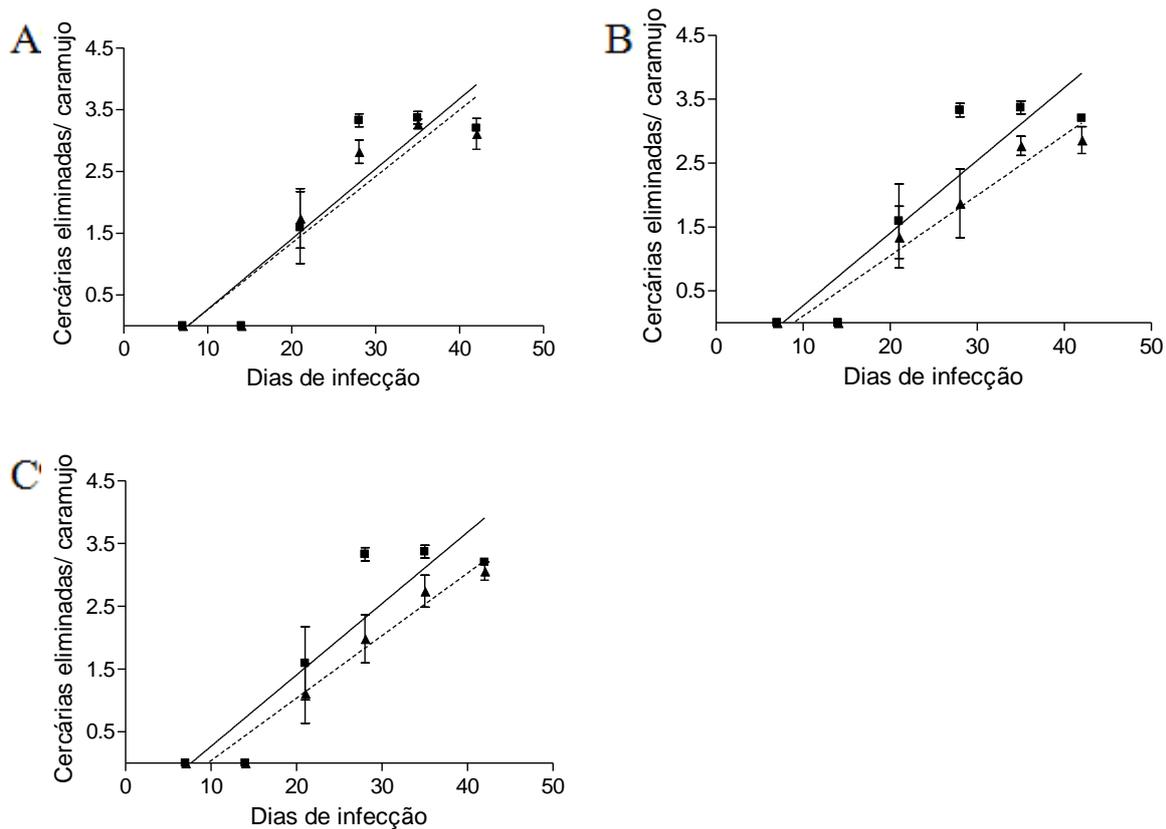


Figura 3: Relação entre a eliminação de cercária por *Biomphalaria glabrata* e o tempo (em dias) de infecção por *Schistosoma mansoni*. A = relação entre a eliminação de cercária por caramujo do grupo controle (■, linha contínua, $r^2 = 0.83$) e a eclosão do miracídio na presença do látex (▲, linha pontilhada, $r^2 = 0.87$), B = relação entre a eliminação de cercária por caramujo do grupo controle (■, linha contínua, $r^2 = 0.83$) e a infecção do miracídio no molusco em presença do látex (▲, linha pontilhada, $r^2 = 0.94$) e C = relação entre a eliminação de cercária por caramujo do grupo controle (■, linha contínua, $r^2 = 0.83$) e a eclosão e infecção do miracídio na presença do látex (▲, linha pontilhada, $r^2 = 0.96$). Dados em média e desvio-padrão. Resultados em $\text{Log}_{10}(x)$

4.4 - DISCUSSÃO

Moluscidas apresentam um importante papel no controle da esquistossomose em todo o mundo, por reduzirem drasticamente populações de moluscos hospedeiros intermediários em curto prazo (HAMED, 2010). Até o presente momento, o uso de compostos com atividade moluscidas para o controle da esquistossomose teve por objetivo a redução de hospedeiros intermediários não infectados e infectados de forma seletiva (SCHALL *et al.* 2001, VASCONCELLOS & AMORIN, 2003, MELLO-SILVA, 2005) ou o efeito negativo sobre os metabolismos de carboidrato e de proteína e atividade reprodutiva dos moluscos após a ação do produto (MELLO-SILVA *et al.*, 2007, 2010, 2011, LIMA, 2010). Pela primeira vez observa-se que o contato de ovos e miracídios com a dose sub letal (DL₅₀) de *E. milii* var. *hislopii* influenciou negativamente o desenvolvimento do ciclo de vida de *S. mansoni* em seu hospedeiro intermediário, promovendo efeitos mais amplos do que os mencionados anteriormente em focos epidemiológicos da esquistossomose.

O potencial epidemiológico da esquistossomose em determinado foco endêmico está diretamente relacionada com o número de caramujos infectados por *S. mansoni* e o número de cercárias eliminadas por estes. Os resultados obtidos demonstram que os tratamentos tanto da forma evolutiva ovo, como miracídio, podem controlar /interferir na dinâmica do ciclo de *S. mansoni*. Souza *et al.* (1994), observaram que a taxa de infecção de 6% de caramujos *B. glabrata* foi responsável por uma prevalência de 14,3% para esquistossomose em um foco epidemiológico de esquistossomose mansoni em Belo Horizonte, MG, Brasil. Os resultados do presente estudo demonstraram que o contato com o látex reduziu a sobrevivência e a taxa de infecção dos caramujos.

O uso da DL₅₀ do extrato aquoso de *E. splendens* var. *hislopii* em *B. glabrata* acarretou em alterações no metabolismo de carboidratos e protéico, após 24 horas de exposição (MELLO-SILVA *et al.* 2010, 2011). Segundo os autores foi observada intensa redução na atividade reprodutiva do caramujo devido à resposta fisiológica frente ao fator de stress (látex). Na infecção de *B. glabrata* por *S. mansoni* são observados mecanismos glicostáticos semelhantes aos provocados por compostos moluscidas onde a redução dos conteúdos de carboidratos está associada à magnitude do fator de stress (LIEBSCH & BECKER, 1990). O aumento na atividade reprodutiva

de moluscos submetidos a fatores de stress é um mecanismo conhecido como compensação reprodutiva. De Jong-Brink *et al.* (1988) demonstraram que a presença do parasito intra-molusco está associada ao aumento do neuropeptídeo schistosomina e o aumento deste peptídeo na corrente hemolinfática do molusco é antagônica à calfluxina, peptídeo responsável pela atividade reprodutiva em gastrópodes. Nesse estudo, as altas quantidades de cercárias eliminadas por caramujo e as baixas quantidades de ovos produzidos pelo grupo sem tratamento (controle) indicam a maior carga parasitária dos hospedeiros, o que interfere negativamente nas reservas glicídicas e conseqüentemente, na atividade reprodutiva desses moluscos.

O efeito de moluscidas sobre as formas de *S. mansoni* livres no ambiente límnico são escassos na literatura (DE-CARVALHO *et al.* 1998). Quanto aos produtos sintéticos, Mostafa (2006), observou, similarmente, redução na taxa de infecção e na quantidade de cercárias eliminadas por caramujo quando miracídios foram previamente tratados, no entanto, foi observada a ação tóxica em organismos não alvos. Estudos com óleos essenciais também demonstraram resultados promissores no controle dos hospedeiros intermediários. O monoterpeno timol apresentou considerável atividade moluscida frente a *B. alexandrina*, *Bulinus truncatus* e *Lymnaea natalensis* e quando miracídios foram expostos ao composto, foi observada redução em 43.1% na taxa de infecção de caramujos (EL-DIN, 2006). Corroborando os resultados encontrados no presente estudo, Barky & Mohamed (2011), expuseram miracídios a doses subletais do látex de *E. milii* e observaram redução na taxa de infecção e na quantidade de cercárias eliminadas por *B. alexandrina*, durante o período patente da infecção.

4.5- CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou a redução da taxa de infecção do miracídio de *S. mansoni* e o número de cercárias eliminadas durante o período patente da infecção, mediante a ação do látex de *E. milii* var. *hislopii* em ovos e miracídios. O uso de compostos naturais, biodegradáveis e em baixas doses com substâncias já caracterizadas quanto ao seu potencial eco-toxicológico é uma importante ferramenta para a redução da transmissão e morbidade da esquistossomose. A DL₅₀ do látex de *Euphorbia milii* apresentou ação tóxica para ovos e miracídios interferindo na dinâmica parasitária de *Schistosoma mansoni* sendo promissor o uso desse produto em ações para o controle da esquistossomose.

4.6- REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AUGUSTO, R.C.; MAGALHÃES A.C.S.; NASCIMENTO A.C.; DORNELLAS T.C.B; CORREA E.E.; MELLO-SILVA, C.C.C. 2009. Fatores ambientais favoráveis a manutenção de populações de *Biomphalaria glabrata* (linhagem BH) em laboratório para fins de pesquisa. In: 9º Congr. De Ecol. Do Brasil. Anais. P. 1524, São Lourenço.

BARKY, F.A.; MOHAMED, R.T. Impact of *Euphorbia milii* latex on infectivity of *Schistosoma mansoni* larval stages to their hosts. **J. of Evolut. Biol. Research.** v. 3.p. 101-107. 2011.

DE-CARVALHO,R.R; MALDONADO JR, A.; OLIVEIRA-FILHO, E.C.; RIBEIRO, A.C. PAUMGARTTEN, F.J.R.; REY, L. Effects of *Euphorbia milii* Latex on *Schistosoma mansoni* Eggs, Miracidia and Cercariae. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 93, Suppl. I: 235-237, 1998.

EL-DIN, A.T. Molluscicidal effect of three monoterpenes oils on Schistosomiasis and fascioliasis vector snails in Egypt. **J. Egypt. Soc. Parasitol.** v. 36. p. 599-612. 2006.

ENGELS, D., CHITSULO, L., MONTRESOR, A.; SAVIOLI, L. The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. **Acta Trop.** v. 82. p. 139–146. 2002.

FINNEY, D. J. **Probit Analysis.** 3rd ed., Cambridge University Press, New Delhi, 333pp, 1971.

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

HAMED, M.A. Strategic control of schistosome intermediate host. **Asian J. of Epidemiol.** v. 3. p. 123-140. 2010.

JONG-BRINK, M.; ELSAADANY, M.M.; BOER, H.H. Schistosomin, antagonist of Calfluxin. **Exp Parasitol.**v. 65. p. 109–118. 1988.

LEMMICH, E., CORNETT, C., FURU, P., JORSTIAN, C.L., KNUDSEN, A.D., OLSEN, C.E., SALIH, A., THILBORG, S.T., Molluscicidal saponins from *Catunaregam nilotica*. **Phytochemistry**. v. 39.p. 63–68. 1995.

LI, Y. S., RASO, G., ZHAO, Z. Y., HE, Y. K., ELLIS, M. K.; MCMANUS, D. P. Large water management projects and schistosomiasis control, Dongting Lake region, China. **Emerg Infect Diseases**. v. 13.p. 973–979. 2007.

LIEBSCH M, BECKER W. Comparative glucose tolerance studies in the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*: influence of starvation and infection with the trematode *Schistosoma mansoni*. **J Comp Physiol B**. v.166 p.41-50, 1990.

MALDONADO JR, 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 southeastern Brazil. **J. Helminthology**. v. 80, p. 369-375. 2006.

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

MELLO-SILVA CC, DE VASCONCELLOS MC, BEZERRA JC, RODRIGUES MDE L, PINHEIRO J. The influence of exposure to *Euphorbia splendens* var. *hislopii* latex on the concentrations of total proteins and nitrogen products in *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni*. **Acta Trop**. v.117.p. 101-104. 2011.

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

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

MENDES, N.M., VASCONCELLOS, M.C., BAPTISTA, D.F., ROCHA, R.S. AND SCHALL, V.T.,). Evaluation of the Molluscicidal Properties of *Euphorbia*

splendens var. *hislopii* (N.E.B.) Latex: Experimental Test in an Endemic Area in the State of Minas Gerais, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 92, p. 719-724. 1997.

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

MOSTAFA, B.B. Effect on tree dormant oils on Schistosomiasis and fascioliasis vector snails and its relation with some non-target snails. **J. Egypt. Soc. Parasitol.** v. 36: p. 809-826. 2006.

OLIVEIRA-FILHO, E. C.; DE CARVALHO, R. R.; PAUMGARTTEN, F. J. R. The influence of environmental factors on the molluscicidal activity of *Euphorbia milii* látex. **J. Env. Sci. Healt.** v. 34, p. 289-303. 1999.

OLIVEIRA-FILHO, E. C; GERALDINO, BR; COELHO, DR; DE CARVALHO, R. R.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Comparative toxicity of *Euphorbia milii* látex and synthetic molluscicides to *Biomphalaria glabrata* embryos. **Chemosphere.** v. 81, p. 218-227. 2010.

SCHALL VT, VASCONCELLOS MC, ROCHA RS, SOUZA CP, MENDES NM. The control of the schistosome-transmitting snail *Biomphalaria glabrata* by the plant molluscicide *Euphorbia splendens* var. *hislopii* (syn *milli* Des. Moul): a longitudinal field study in an endemic area in Brazil. **Acta Trop.** v. 79, p. 165-170. 2001

SCHALL VT, VASCONCELLOS MC, VILLAÇA-COELHO, AL; FERREIRA-LOPES, FE; SILVA, IP. 1992. Evaluation of temporal, seasonal and geographic stability of the molluscicidal property of *Euphorbia splendens* latex. **Rev. Inst. Med. Trop.** v.34. 1992.

SINGH, D.K., AGARWAL, R.A. Correlation of the anti-cholinesterase and molluscicidal activity of the latex of *Euphorbia royleana*. **J. Nat. Prod.** v. 47, p. 702–705. 1984.

SOUZA, C. A.; DE CARVALHO R. R.; KURIYAMA S.N.; ARAÚJO, I.B. RODRIGUES, R.P.; VOLLMER, R.S.; ALVES, E.M. & PAUMGARTTEN, F.J.R. Study of the embriofeto-toxicity of “crow of thorns” (*Euphorbia milii* var *hislopii*) latex, a natural molluscicide. **Braz J. Med Biol. Res.** v. 30, p. 1325-1332. 1997.

STEINMANN, P., KEISER, J., BOS, R., TANNER, M.; UTZINGER, J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. **Lancet Infect Diseases**. v. 6. p. 411–425. 2006.

STOTHARD, J. R.; GABRIELLI, A. F. Schistosomiasis in African infants and preschool children: to treat or not to treat ? **Trends in Parasitol** v. 23. p. 83–86. 2007.

UTZINGER, J.; SAVIGNY, D. Control of neglected tropical diseases: integrated chemotherapy and beyond. **PLoS Medicine**. v. 3. p. 112. 2006.

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

VASCONCELLOS, MC, AMORIN A. Molluscicidal action of the latex of *Euphorbia splendens* var. *hislopii* N.E.B ("Christ's Crown") (Euphorbiaceae) against *Lymnaea columella* (Say, 1817) (Pulmonata: Lymnaeidae), intermediate host of *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 (Trematoda: Fasciolidae). 1- Test in laboratory. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 98.p. 557-563. 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Immunization. 2011. Disponível em: <http://www.who.int/topics/immunization/en/> 31.04.

ZAMITH, H.P.S, PAUMGARTTEN, F.J.R, SPEIT, G. Evaluation of the mutagenicity of the moluscicidal latex of Christ's Crown (*Euphorbia milii* var *hislopii*) in mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. **Mutagenic Res**. v. 368. p. 15-20. 1996.

ZHOU, X. N., YANG, G. J., YANG, K., WANG, X. H., HONG, Q. B., SUN, L. P., MALONE, J. B., KRISTENSEN, T. K., BERGQUIST, N. R.; UTZINGER, J. Potential impact of climate change on schistosomiasis transmission in China. **Americ J of Trop Med and Hyg**. v. 78. p. 188–194. 2008.

**5 - CAPÍTULO 3- INFLUÊNCIA DO LÁTEX DE *Euphorbia milii* (syn. *splendens*)
var. *hislopii* NA FORMAÇÃO DE *Schistosoma mansoni* NO HOSPEDEIRO
DEFINITIVO**

CAPÍTULO 3- INFLUÊNCIA DO LÁTEX DE *Euphorbia milii* (syn. *splendens*) var. *hislopii* NA FORMAÇÃO DE *Schistosoma mansoni* NO HOSPEDEIRO DEFINITIVO

RESUMO

A relação entre o efeito da dose subletal do látex de *Euphorbia milii* (syn. *splendens*) var. *hislopii* e o tempo, sobre cercárias de *Schistosoma mansoni* e seu desenvolvimento no hospedeiro definitivo foram estudados. Com o objetivo de avaliar as características da ação do látex, quatro grupos experimentais foram realizados: GRUPO1 - controle 1 hora (cercárias mantidas em água destilada), GRUPO 2 - tratamento 1 hora (cercárias mantidas na dose subletal do látex por 1 hora), GRUPO 3 - controle 3 horas (cercárias em água destilada por 3 horas), GRUPO 4 - cercárias tratadas durante 3 horas. Foi observada redução no número de ovos nos grupos 2 e 4, em comparação ao seus controles, grupos 1 e 3, respectivamente. Quanto ao tempo de tratamento, houve redução de 43% na primeira hora de tratamento de cercárias com o látex e de 90,6% após a terceira hora, quando comparado ao grupo 1. O número médio de vermes formados entre os grupos divergiu estatisticamente ($p < 0,05$). A formação de vermes no grupo 1 foi 65% superior que a observada no grupo 4, onde as cercárias foram tratadas por 3 horas. A análise histopatológicos demonstrou não haver diferenças entre os camundongos dos grupos controle e dos grupos tratados. Conclui-se que a dose subletal do látex de *E. milii* apresenta propriedade esquistossomicida, pois reduz a produção de vermes e sua atividade reprodutiva, podendo ser utilizada também no controle da morbidade da esquistossomose mansônica.

PALAVRAS-CHAVE: *Schistosoma mansoni*, *esquistossomicida*, *Euphorbia milii*

CHAPTER 3- INFLUENCE OF *Euphorbia milli* var *hislopii* LATEX IN THE FORMATION OF *Schistosoma mansoni* IN ITS DEFINITIVE HOST

ABSTRACT

The relationship between the effect of a sub-lethal dose of the *Euphorbia milli* (syn. *splendens*) var. *hislopii* latex and time on cercariae of *Schistosoma mansoni* and its development in the definitive host were studied. In order to characterize the action of the latex, four experimental groups were observed: GROUP 1 - control 1 hour (cercariae maintained in distilled water), GROUP 2 - 1 hour treatment (cercariae maintained in sub-lethal dose of latex for 1 hour), GROUP 3 - control 3 hours (cercariae in distilled water for 3 hours), GROUP 4 - cercariae treated for 3 hours. There was a reduction in the number of eggs in groups 2 and 4, compared to their controls, groups 1 and 3, respectively. Regarding the time of treatment, there was a 43% reduction in the first hour of treatment of cercariae with the latex and 90.6% after the third hour, compared to group 1. The average number of worms formed between the two groups differed statistically ($p < 0.05$). The formation of worms in group 1 was 65% higher than that observed in group 4, where the cercariae were treated for 3 hours. The histopathological analysis showed no differences between mice in the control group and treated groups. We conclude that the sub-lethal dose of the *E. milli* latex shows schistosomicidal property because it reduces the production of worms and their reproductive activity, and so it can also be used to control schistosomiasis morbidity.

KEYWORDS: *Schistosoma mansoni*, schistosomicidal, *Euphorbia milli*

5.1- INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma endemia de significativa importância socioeconômica que acomete, principalmente, países em desenvolvimento (WHO, 2011). Atualmente, 240 milhões de pessoas estão infectadas (97% na África) e mais de 700 milhões vivem em risco de contrair a infecção, sendo 85% habitantes do continente africano (OLLIARO *et al.* 2011). Praziquantel (PZQ) é o principal composto utilizado para redução da morbidade, sendo recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS), a administração, em dose única, de 40 mg/Kg para o tratamento de esquistossomose intestinal e urinária.

Embora o PZQ seja altamente eficaz, o baixo número de compostos disponíveis para o controle da esquistossomose é preocupante (KATZ, 2008; PICA-MATTOCCIA & CIOLI, 2004). Aspectos como a diferença de tolerância entre Oxamniquine e PZQ (GRYSEELS *et al.* 2001), e a indução, em laboratório, de resistência a linhagens de diferentes espécies de *Schistosoma*, incluindo a *mansoni*, abre espaço a hipótese que dentro de pouco tempo, poderão ser encontradas resistências, principalmente nos países onde há maior utilização destes medicamentos (LAGE, 2010).

O desenvolvimento drogas esquistossomicidas foi e é responsável por significativa redução da morbidade da doença em todo o mundo, entretanto, a diminuição na transmissão do parasito não foi alcançada (OLIVEIRA, 2006). Segundo Katz (2003), programas baseados no controle da morbidade são insuficientes para conter a incidência da esquistossomose, sendo necessárias ações que associem tanto a diminuição da morbidade como da transmissão, interrompendo o ciclo evolutivo do parasito. Nesse sentido, o uso de compostos fitoterápicos em recursos hídricos infectados tem sido uma importante ferramenta no controle da transmissão da esquistossomose.

A co-evolução decorrente da interação inseto-planta promoveu, ao longo do tempo, o desenvolvimento de muitos metabólitos fitoquímicos secundários como estratégia de defesa contra predação e patógenos. Determinados metabólitos são capazes de interromper rotas fisiológicas específicas relacionadas com sistemas neuroendócrino, reprodutivo e comportamental de invertebrados e assim, podem atuar no controle

populacional de vetores, como artrópodes e moluscos (MELLO *et al.* 2010). Dentre os compostos pesquisados, o extrato de *Euphorbia milli* (syn. *splendens*) var. *hislopii* apresentou a maior bioatividade frente a exemplares de moluscos (MELLO-SILVA *et al.* 2010) e é o principal candidato moluscicida para ser utilizado em campanha de controle de larga escala da esquistossomose (MELLO-SILVA, 2005).

Durante o desenvolvimento do ciclo de *Schistosoma mansoni*, hospedeiro intermediário e formas larvares encontram-se expostos à ação de compostos dissolvidos no recurso hídrico. Caramujos e cercárias são permeáveis a ação de grandes moléculas, e assim, moléculas específicas podem gerar implicações consideráveis no crescimento e desenvolvimento da dinâmica parasitária (THORNHILL *et al.* 2010).

O uso da dose sub letal (DL₅₀) do extrato aquoso de *E. milli* (syn. *splendens*) var. *hislopii* sobre caramujos *Biomphalaria glabrata* altera a sobrevivência, reprodução e estoques energéticos, principalmente de caramujos infectados, sinalizando para uma possível seletividade deste composto frente a dinâmica de *S. mansoni*. Entretanto, estudos que avaliem a ação de moluscicidas vegetais sobre cercárias e caramujos infectados sobre a formação de vermes adultos de *S. mansoni* são escassos na literatura (DE- CARVALHO *et al.* 1998).

Neste sentido, o presente trabalho tem por objetivo avaliar a intensidade da infecção parasitária decorrente do tratamento de cercárias de *S. mansoni* com o látex de *E. milli* (syn. *splendens*) var. *hislopii*.

5.2- MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Determinação da concentração letal e sub letal

Idem ao item 3.2.1

5.2.2 Animais

Foram utilizados ao longo de todos os testes, camundongos fêmeas da linhagem Swiss albina, provenientes do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL – FIOCRUZ/ Rio de Janeiro). Estes foram mantidos segundo as normas de bioética e biossegurança do biotério do Pavilhão Cardoso Fontes, em microisoladores (Figura 1), sob condições padronizadas de temperatura (22 a 23°C) e luminosidade (ciclos de 12 h de claro e 12 h de escuro). A utilização desses animais no presente trabalho foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-FIOCRUZ) sob licença nº L-0063/08.



Figura 1. Rack ventilado com para biotério com capacidade para 48 microisoladores

5.2.3 Obtenção de cercárias e infecção

Cercárias provenientes de caramujos *B. glabrata* (linhagem Belo Horizonte - BH) obtidos do moluscário do Laboratório de Esquistossomose Experimental (LEE) do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, RJ, infectados individualmente com 7 ± 1 miracídios de *S. mansoni* foram utilizados neste experimento. Para obtenção de cercárias, os

caramujos foram expostos à luz artificial durante o período de 1 hora e após este período, as cercárias foram coradas com lugol e quantificadas (figura 2).

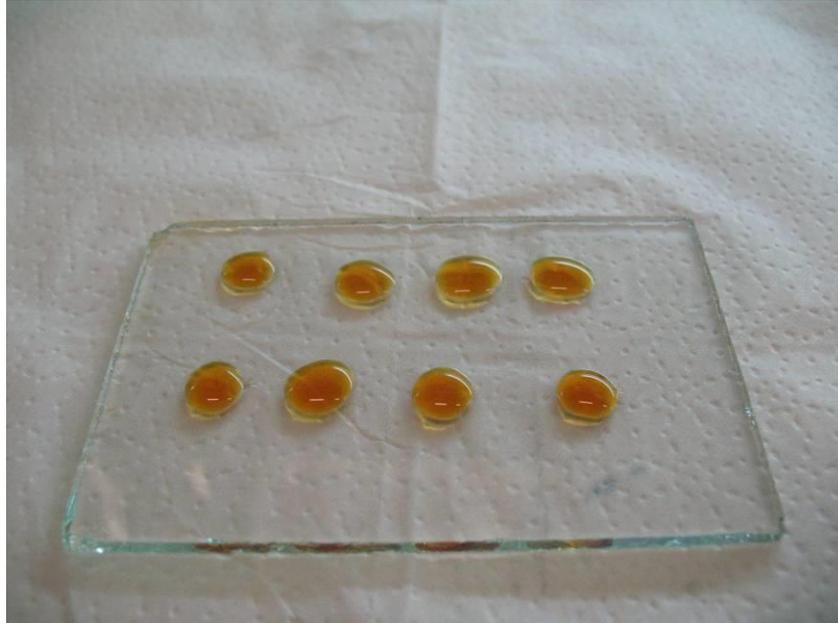


Figura 2. Gotas de lugol contendo cercárias, durante observação em microscópio estereoscópico

5.2.4 Grupos experimentais

Com o objetivo de avaliar as características da ação do látex de *E. milii* (syn. *splendens*) var. *hislopii* sobre o verme adulto de *S. mansoni*, foram realizados dois protocolos experimentais. No primeiro momento, foi realizado experimento com 10 camundongos infectados a partir de cercárias tratadas com a dose subletal do látex por um período de 1 hora e 10 camundongos foram infectados com cercárias sem tratamento, atuando assim como grupo controle. Ressalta-se que as cercárias foram obtidas a partir de caramujos infectados para a manutenção do ciclo sem tratamento prévio com o látex de *E. milii*. Tal experimento foi realizado com o objetivo de verificar a possível proteção a partir do contato das formas infectantes cercárias com o látex. Após a análise dos resultados e a confirmação da hipótese primária, foram estipulados, além dos grupos existentes, mais dois grupos para avaliar as características da proteção conferida por esse produto, sendo utilizados ao todo 60 camundongos subdivididos em quatro subgrupos: GRUPO1- controle 1 hora (cercárias eliminadas sem tratamento), GRUPO 2- cercárias eliminadas de 30 caramujos infectados sem tratamento em 50 ml de água destilada e tratadas com 50 ml de dose subletal do látex por 1 hora, GRUPO 3-

controle 3 horas (manutenção das cercárias em água destilada por este período), GRUPO 4- cercárias tratadas 3 horas (idem ao grupo 2 com um tempo maior de permanência no látex).

Todos os camundongos foram infectados individualmente, com 150 cercárias distribuídas em aproximadamente 50 mL de água/ ou solução aquosa de látex dependendo do grupo experimental (figura 3).



Figura 3. Infecção subcutânea de camundongos Swiss com 150 cercárias de *Schistosoma mansoni*

5.2.5 Parâmetros analisados

Com o intuito de caracterizar a ação do látex frente a presente relação parasito-hospedeiro, os seguintes parâmetros foram analisados:

Número de ovos por grama de fezes (OPG)

Foram realizadas três análises do OPG através do método de Kato-Katz em cada grupo experimental. As fezes foram coletadas no biotério pelo período da manhã, em cristalizadores pelo período de uma hora (figura 4). Foram realizadas 3 lâminas (figura 5) por grupo e feita a contagem dos ovos, através do microscópio.



Figura 4. Camundongos em cristalizadores para a coleta de fezes

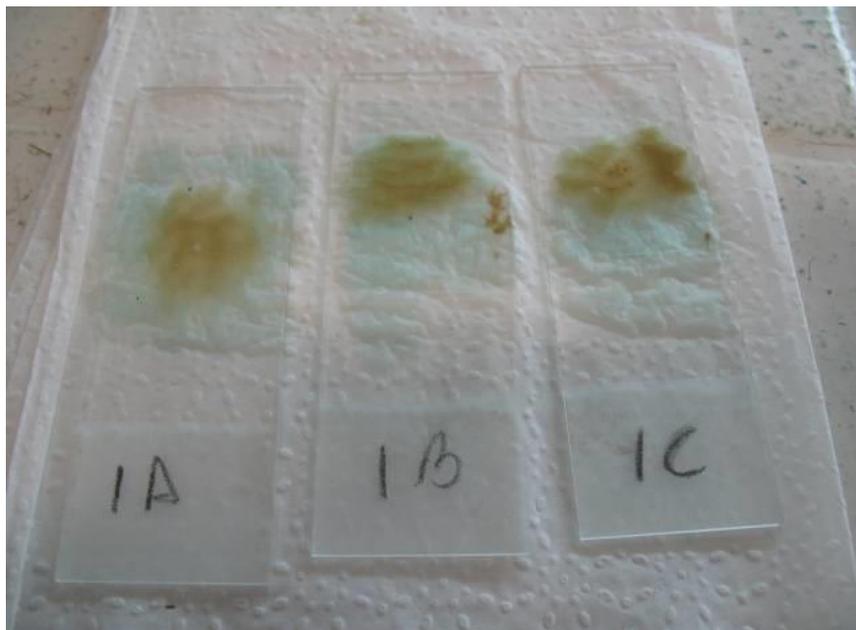


Figura 5. Lâminas de fezes processadas, segundo a técnica de Kato-Katz.

Quantificação de vermes adultos

A coleta e quantificação dos vermes foram realizadas após a perfusão do sistema venoso portal dos camundongos, com no mínimo 90 dias de infecção. O procedimento iniciou-se com uma incisão próxima aos órgãos genitais indo até a caixa torácica. A veia porta foi, então, seccionada e o ventrículo esquerdo perfundido com solução PBS para a retirada dos vermes do sistema portal mesentérico, os quais foram quantificados. Após a perfusão, todos os órgãos foram removidos e armazenados em Milloning para posterior análise patológica. Posteriormente, o fígado foi seccionado em três fragmentos destinados a estudo histopatológico.

Análise histopatológica

Logo após a perfusão, amostras de fígado foram fixadas em Milloning, para posterior estudo histológico. Após sucessivas lavagens com etanol a 70% para completa remoção do fixador, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol a partir de 70% até álcool absoluto. Após essa etapa, as amostras foram diafanizadas em xilol e impregnadas em parafina histológica fundida a 60°C. Posteriormente, foram incluídas em parafina, cortadas em micrótomo rotativo (Leica: modelo RM2125RT, Nussloch - Germany), obtendo-se cortes de 5 µm de espessura. Os cortes destinados ao estudo histopatológico foram corados pela hematoxilina/eosina (HE).

5.2.6 Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos através de média \pm desvio-padrão e submetidos ao teste de análise de variância (ANOVA) e ao teste t de Student ($\alpha=5\%$) (Instat, GraphPad, v.4.00, Prism, GraphPad, v.3.02, Prism inc.).

5.3 RESULTADOS

A dose letal (DL₉₀) e a dose sub letal (DL₅₀) encontrada no presente estudo foi de 2,7 mg/L e 1,4mg/L ($x^2 = 5,7$; $x^2 \text{ tab} = 14,07$; g.l. = 7), respectivamente. O resultado da sobrevivência de camundongos Swiss webster a infecção com cercárias tratadas (Grupos 2 e 4) e não tratadas (Grupos 1 e 3) está demonstrado na tabela 1. A sobrevivência dos camundongos variou de acordo com o grupo experimental, não sendo possível definir um padrão decorrente do tratamento. No Grupo 2 foi observada sobrevivência 24% superior a observada no Grupo 1 (controle de uma hora) e a sobrevivência no Grupo 4 não variou quando comparada ao seu controle (Grupo 3) (Tabela 1).

A quantidade de ovos eliminados pelas fezes está diretamente associada ao potencial de contaminação do ambiente hídrico por ovos de *S. mansoni*. Foi observada redução no número de ovos eliminados nos grupos de animais infectados com cercárias expostas ao látex, Grupo 2 e 4, em comparação ao seus controles, Grupos 1 e 3, respectivamente. Quanto ao tempo de tratamento, houve redução de 43% na primeira hora de tratamento de cercárias com o látex e de 90,6% após a terceira hora, quando comparado ao Grupo 1 (Figura 6).

Tabela 1. Efeito do tratamento com a DL₅₀ do extrato aquoso de *Euphorbia milii* (*syn. splendens*) var. *hislopilii* na biologia reprodutiva de *Schistosoma mansoni* em Swiss webster infectado em laboratório. Letras diferentes significam diferenças estatísticas entre o grupo ($\alpha = 5\%$). Grupo 1= cercárias mantidas em água destilada durante o período de uma hora; Grupo 2= cercárias expostas ao látex durante o período de uma hora; Grupo 3= cercárias mantidas em água destilada durante o período de três horas; Grupo 4= cercárias expostas ao látex durante o período de três horas.

GRUPO	Número de animais	Número de ovos	Ovos/camundongo	OPG/camundongo
GRUPO 1	16	150	9.3±5.3 ^a	223.2±129 ^a
GRUPO 2	21	85	4.0±2.4 ^a	96±58.7 ^a
GRUPO 3	12	22	1.8±5.1 ^a	43.2±123.2 ^a
GRUPO 4	12	14	1.1±4.6 ^a	26.4±96.9 ^a

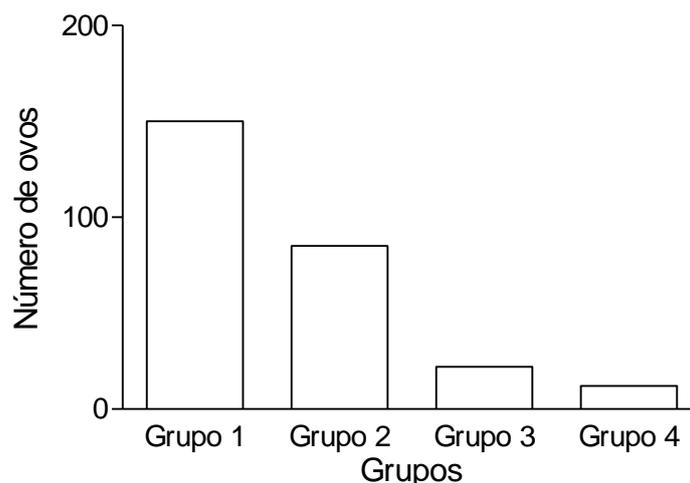


Figura 6. Efeito do tratamento com a DL_{50} do extrato aquoso de *Euphorbia milii* (syn. *splendens*) var. *hislopilii* na eliminação de ovos de *Schistosoma mansoni* em Swiss webster infectado em laboratório. Grupo 1= cercárias mantidas em água destilada durante o período de uma hora; Grupo 2= cercárias expostas ao látex durante o período de uma hora; Grupo 3= cercárias mantidas em água destilada durante o período de três horas; Grupo 4= cercárias expostas ao látex durante o período de três horas

Quanto à média de ovos por grama de fezes (OPG) recuperados nos camundongos do grupo controle de uma hora (Grupo 1) foi 57% superior ao observado no grupo onde os camundongos foram infectados com cercárias expostas a ação do látex pelo mesmo período de uma hora (Grupo 2). Quanto ao grupo exposto durante três horas ao tratamento com o látex (Grupo 3), foi observada redução de 88% e 39%, comparando-se os controles de uma hora (Grupo 1) e três horas (Grupo 4), respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2. Efeito comparativo do tratamento com a DL_{50} do extrato aquoso de *Euphorbia milii* (syn. *splendens*) var. *hislopilii* na biologia reprodutiva e formação de vermes adultos de *Schistosoma mansoni* em Swiss webster infectado em laboratório. Grupo 1= cercárias mantidas em água destilada durante o período de uma hora; Grupo 2= cercárias expostas ao látex durante o período de uma hora; Grupo 3= cercárias mantidas em água destilada durante o período de três horas; Grupo 4= cercárias expostas ao látex durante o período de três horas.

Grupos	Taxa (%) de variação de OPG/camundongo	Taxa (%) de variação de vermes/camundongo
Grupo 1- Grupo 2	- 57%	-21%
Grupo 1- Grupo 3	- 80%	-57%
Grupo 1- Grupo 4	-88%	-65%
Grupo 2- Grupo 3	-55%	-45%
Grupo 2- Grupo 4	-72%	-56%
Grupo 3- Grupo 4	-39%	-19%

Na tabela 3 podemos observar o número médio de vermes formados a partir de cercárias tratadas ou não com o látex de *E. millii* (syn. *splendens*) var. *hislopii*, em cada grupo. O contato deste produto com cercárias de *S. mansoni* por um período de uma hora reduziu a formação de vermes em 21% e atividade reprodutiva (OPG) em 57% (Tabela 2). Após a perfusão, o número de vermes recuperados por camundongo divergiu estatisticamente ($p < 0,05$) entre os grupos (Tabela 3). A formação de vermes no grupo 1 foi 65% superior que a observada no grupo 4, onde as cercárias foram tratadas por 3 horas (Figura 7).

Tabela 3. Efeito do tratamento com a DL_{50} do extrato aquoso de *Euphorbia milii* (syn. *splendens*) var. *hislopii* na formação de vermes adultos de *Schistosoma mansoni* em Swiss webster infectado em laboratório. Letras diferentes significam diferenças estatísticas entre os grupo ($\alpha = 5\%$). Grupo 1= cercárias mantidas em água destilada durante o período de uma hora; Grupo 2= cercárias expostas ao látex durante o período de uma hora; Grupo 3= cercárias mantidas em água destilada durante o período de três horas; Grupo 4= cercárias expostas ao látex durante o período de três horas

GRUPO	Número de animais	Número de vermes/ camundongo
GRUPO 1	16	7.2 ± 3.5^a
GRUPO 2	21	$5.7 \pm 3.9^{a,c}$
GRUPO 3	12	$3.1 \pm 0.2^{b,c}$
GRUPO 4	12	2.5 ± 0.7^b

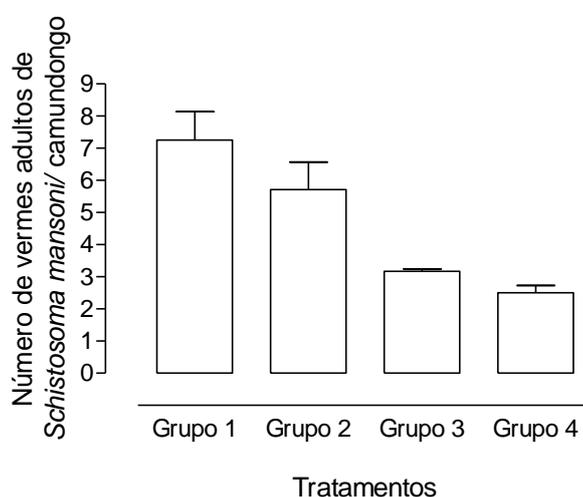


Figura 7. Efeito do tratamento com a DL_{50} do extrato aquoso de *Euphorbia milii* (syn. *splendens*) var. *hislopii* na formação de *Schistosoma mansoni* em Swiss webster infectado em laboratório. Grupo 1= cercárias mantidas em água destilada durante o período de uma hora; Grupo 2= cercárias expostas ao látex durante o período de uma hora; Grupo 3= cercárias mantidas em água destilada durante o período de três horas; Grupo 4= cercárias expostas ao látex durante o período de três horas.

Foram observados aspectos histopatológicos dos animais dos grupos controle (Grupos 1 e 2) e dos animais dos grupos expostos (Grupos 3 e 4). Em ambos os grupos constatou-se a presença de granulomas periovulares, isolados e esparsamente distribuídos pelo parênquima hepático, às vezes formando conglomerados, não sendo possível constatar diferenças entre os grupos. Além disto, em muitos desses granulomas notava-se deposição de pequena quantidade de colágeno. Também ocorria intensa infiltração eosinofílica nos médios e grandes espaços-porta e, às vezes, na porção central dos granulomas (Figura 8 e 9).



Figura 8. Camundongo do grupo controle com 60 dias de infecção pelo *Schistosoma mansoni*. Presença de eosinofilia intensa em torno do ovo com miracídio em desintegração e alguns mononucleares permeando o infiltrado eosinofílico. Barra de 200 μ m.

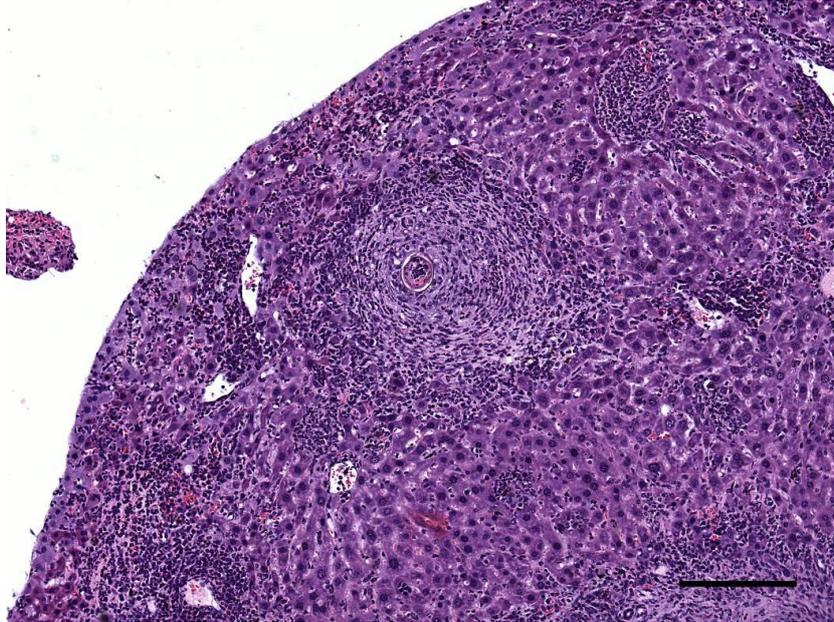


Figura 9. Camundongo do grupo exposto a DL₅₀ do látex de *Euphorbia milli* com 60 dias de infecção pelo *Schistosoma mansoni*. Presença de eosinofilia intensa em torno do ovo com miracídio em desintegração e alguns mononucleares permeando o infiltrado eosinofílico. Barra de 200 µm.

5.4- DISCUSSÃO

Neste trabalho são apresentados os resultados da ação do látex de *E. milii* (syn. *splendens*) var. *hislopii* em cercárias de *S. mansoni* e sua influência na biologia reprodutiva e formação de vermes adultos. Até o presente momento, esse composto foi extensivamente pesquisado como agente moluscicida, sendo escassa a investigação de seu efeito sobre o potencial infectivo dos estágios larvares (miracídeos e cercárias) de *S. mansoni* e de outros trematódeos em seus respectivos hospedeiros (DE CARVALHO *et al.* 1998). Segundo Mello-Silva (2005), este produto é o principal moluscicida vegetal no controle da esquistossomose por apresentar seletividade para hospedeiros intermediários infectados, ser biodegradável e não ter efeitos em organismos não alvos nas doses utilizadas. No presente estudo é sinalizado que este composto também apresenta ação sobre a forma larvar cercária, reduzindo a formação de parasitos no hospedeiro definitivo e conseqüentemente à produção de ovos pela fêmea, o que proporciona menor contaminação do recurso hídrico com ovos oriundos de fezes de hospedeiros infectados.

Diversas drogas têm sido utilizadas como esquistossomicidas, os medicamentos são administrados por via oral ou via intramuscular nos hospedeiros definitivos, no caso o homem, com a finalidade de destruir o parasito e/ou reduzir a produção de ovos. Os quimioterápicos mais utilizados no tratamento da esquistossomose são Oxaminiquine e Praziquantel, ambos reduzem em 80% e 95% respectivamente o número de vermes adultos e 100% dos indivíduos tratados possuem alteração no oograma (KATZ, 2008).

Tendo em vista a tolerância ou resistência de drogas no tratamento da esquistossomose, diversos estudos têm sido feitos com outras drogas, priorizando as naturais, oriundas de plantas, com atividade esquistossomicida, sendo a artemisina e seu derivado artemether exemplos. Este fitoterápico também demonstrou que 100% dos indivíduos que sofreram tratamento alteraram a produção de ovos e houve redução de 61,5% no número de vermes adultos (LESCANO *et al.* 2004)

No presente trabalho, a redução mais acentuada do número de vermes foi 88%, e assim, maior que a encontrada para Oxaminiquine e Artemisina, no entanto, esta redução é indireta, pois está relacionada a incapacidade de formação dos vermes, e não a mortalidade dos mesmos, como observamos nas drogas terapêuticas. No produto em

questão, a dose subletal do látex foi aplicado nas cercárias, o que alterou a viabilidade do desenvolvimento do parasito no hospedeiro definitivo, no caso, camundongos.

Outros estudos, visando o controle da infecção em hospedeiros definitivos e a redução indireta de vermes foram realizados. William *et al.* (2001) infectaram moluscos com miracídios oriundos de hospedeiros suscetíveis e resistentes ao tratamento com Praziquantel e observaram a produção de cercárias em *B. alexandrina*. As cercárias eliminadas por estes moluscos foram usadas na infecção de camundongos, a fim de verificar a produção de vermes. Os resultados demonstraram redução na produção de cercárias, vermes e ovos em isolados resistentes a droga.

Couto *et al.* (2011) administraram a dose de 100mg/Kg de Praziquantel, misturadas na comida de caramujos infectados e positivos para *S. mansoni*. As cercárias oriundas de caramujos tratados foram usadas para infecção em camundongos. Após 45 dias da infecção, os camundongos também foram tratados com doses diferentes de praziquantel e observou-se uma redução de 89,9% (400mg/Kg) e 88,1% para 800mg/Kg. A redução na produção de cercárias por caramujos infectados por *S. mansoni* e tratados por via oral por praziquantel também foram realizados (Mattos *et al.* 2006, 2007).

Embora os resultados de William *et al.* (2001) e Couto *et al.* (2011), sejam semelhantes aos encontrados no presente trabalho, a metodologia apresentada apresenta dificuldades quanto a sua aplicação em campo. No presente estudo, o tratamento se dá através da diluição do látex no recurso hídrico, o que torna a sua viabilidade de uso a campo maior. Produtos naturais, biodegradáveis, de fácil absorção pelo caramujo e pelas formas larvares (miracídios e cercárias) tornam-se alvo de estudos para viabilizar o controle da transmissão,

A absorção de grandes moléculas para o interior da cercária está associada à perda da cauda com exposição do nefridióporo e a permeabilidade da membrana de superfície da larva. Segundo Thornhill *et al.* (2010), a entrada de moléculas exógenas ao parasito podem afetar receptores de fatores de crescimento presente no genoma do de *S. mansoni* e afetar o crescimento e desenvolvimento desse em seu hospedeiro intermediário.

Estudos com produtos aplicados na água para verificar a mortalidade de cercárias e seu potencial infectivo também já foram realizados. O principal composto

sintético pesquisado para o controle de moluscos e cercárias de *S. mansoni* é a niclosamida (Bayluscide®). A ação tóxica deste produto sobre cercárias é maior que a observada em moluscos hospedeiros intermediários (TCHOUNWOU *et al.* 1992). O tratamento, por um período de 1 hora, de cercárias com doses menores que 1 mg/l foi suficiente para reduzir em 98% o número de vermes recuperados no grupo tratado em relação ao grupo controle

De-Carvalho *et al.* (1998), compararam o efeito de Bayluscide® (niclosamida) e do látex liofilizado de *E. milii* (syn. *splendens*) var. *hislopii* sobre ovos, miracídios e cercárias de *S. mansoni*. Segundo os autores, o látex tem estreito espectro de ação biocida quando comparado com a niclosamida. Entretanto, o intenso uso de produtos sintéticos no combate a esquistossomose tem apresentado fatores negativos como, o desenvolvimento de resistência nos hospedeiros intermediários, ação sobre organismos não alvos, causando significativa alteração no ecossistema aquático e custo relativamente elevado desses produtos, sendo inviáveis para países de terceiro mundo onde a doença apresenta-se de forma endêmica (MARSTON & HOSTETTMANN, 1985).

Bakry *et al.* (2011) estudaram a ação de *E. milii* em miracídios e cercárias de *S. mansoni* e seu potencial infectivo, verificando redução na produção de cercárias e vermes adultos. No referido estudo a dose subletal utilizada foi 73,6% superior a utilizada na presente dissertação, com resultados similares em relação ao potencial de redução de vermes adultos.

5.5- CONCLUSÃO

Conclui-se que a dose subletal do látex de *E.milii* apresenta propriedade esquistossomicida, pois reduz a produção de vermes e sua atividade reprodutiva, podendo ser utilizada também no controle da morbidade da esquistossomose mansônica.

5.6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARKY, F.A.; MOHAMED, R.T. Impact of *Euphorbia milii* latex on infectivity of *Schistosoma mansoni* larval stages to their hosts. **J. of Evolut. Biol. Research.** v. 3.p. 101-107. 2011.

COUTO, F. F. B.; COELHO, P. M. Z., ARAÚJO, N.; KUSEL, J. R.; KATZ, N.; JANNOTTI-PASSOS, L. K., MATTOS, A. C. A. *Schistosoma mansoni*: a method for inducing resistance to praziquantel using infected *Biomphalaria glabrata* snails. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v.106. p 153-157. 2011.

DE-CARVALHO, R.R., MALDONADO JR., A., OLIVEIRA-FILHO, E.C., RIBEIRO, A.C., PAUMGARTTEN, F.J.R., REY, L. Effects of *Euphorbia milii* látex on *Schistosoma mansoni* eggs, Miracidia and Cercariae. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 93. p. 235–237. 1998.

EL-ANSARY, A.; SAMMOUR, E.M.; SOLIMAN, M.S.; GAWISH, F.A. *In vivo*, attenuation of schistosome cercarial development and disturbance of egg laying capacity in *Biomphalaria alexandrina* using sublethal concentrations of plant molluscicides. **J. Egypt. Soc. Parasitol.**v. 31.p. 657-669. 2001.

FINNEY, D. J. **Probit Analysis.** 3rd ed., Cambridge University Press, New Delhi, 333pp, 1971.

LAGE, R.C.G. **O efeito da pressão seletiva com praziquantel na diversidade genética da Cepa LE de *Schistosoma mansoni*.** Tese USP, São Paulo, SP. 2010.

LIMA, M.G. **Análise fisiológica da ação do látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopii* N.E.B (Euphorbiaceae) sobre *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (Pulmonata, Planorbidae) infectada por *Schistosoma mansoni* Sambom, 1907 (Trematoda, Schistosomatidae), associada ao tempo de degradação do látex.** Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2010.

MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Review article number 6: Plants moluscicidas. **Phytochemistry.** v. 24. p. 639-652. 1985.

MCCLLOUGH, F.S.; GAYRAL, P.; DUNCAN, J.; CHRISTIE, J.D. Molluscicides in schistosomiasis control. **B World Health Organ.** v. 58. p. 681-689. 1980.

MELLO, R.S.; FERREIRA, A.R.S.; QUEIROZ, M.M.C. Bioactivity of latex from *Euphorbia splendens* var. *hislopii* (Euphorbiaceae) on post-embryonic development of *Megaselia scalaris* (Phoridae). **Veterinary Parasitology.** v. 172. p. 100–104. 2010.

MELLO-SILVA, C.C. **Controle alternativo e alterações fisiológicas em *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), hospedeiro intermediário de *Schistosoma mansoni* Sambom, 1907 pela ação do látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopii* N.E.B(Euphorbiaceae).** Tese UFRRJ, Rio de Janeiro, RJ. 2005.

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. **Mem. Do Inst. Oswaldo Cruz.** V. 105, p. 492-495, 2010.

OLLIARO, P.L.; VAILLANT, M.T.; BELIZARIO, V.J.; LWAMBO, N.J.S.; OULDABDALLAHI, M. A.; PIERI, O.S.; AMARILLO, M.L.; KAATANO, G.M.; DIAW, M.; DOMINGUES, A.L.C.; FAVRE, T.C.; LAPUJADE, O.; ALVES, F.; CHITSULO, L. Multicentre Randomized Controlled Trial of the Efficacy and Safety of Single-Dose Praziquantel at 40 mg/kg vs. 60 mg/kg for Treating Intestinal Schistosomiasis in the Philippines, Mauritania, Tanzania and Brazil. **PLoS Negl Trop Dis.** v. 5.p. 1-15. 2011.

SCHALL, V.T.; VASCONCELLOS, M.C.; ROCHA, R.S.; SOUZA, C.P.; MENDE, N.M. The control of the schistosome-transmitting snail *Biomphalaria glabrata* by the plant *Molluscicide Euphorbiasplendens* var. *hislopii*(syn *milli*Des. Moul): a longitudinal field study in an endemic area in Brasil. **Acta Trop.**v. 79.p. 165-170. 2001.

SINGH, S.; SINGH, D.K. Molluscicidal activity of *Abrus precatorius* Linn. and *Argemone mexicana* Linn. **Chemosfere.** v. 38. p. 3319-3328. 1999.

TCHOUNWOU, P. B.; ENGLANDE JR., A. J.; MALEK, E. A.; GREER, G. J.; ANDERSON, A. C. The effects of bayluscide and malathion on the mortality and

infectivity of *Schistosoma mansoni* cercariae. **Environmental Toxicology and Water Quality**. v. 7. p 107–117. 1992.

THORNHILL, J.; KUSEL, J.; OLIVIERA, F.A.; RIBEIRO, F.; LIMA, S.F.; COELHO, P.M.Z.; MCVEIGH, P.; MATTOS, A.C.A. Uptake of macromolecules by cercariae during skin penetration and transformation to schistosomula (*Schistosoma mansoni*). **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 105. p. 387-390. 2010.

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

WILLIAN, S.; SABRA, A.; RAMZY, F.; DEMERDASH, Z.; BENNETT, J. L.; DAY, T. A.; BOTROS, S. Stability and reproductive fitness of *Schistosoma mansoni* isolates with decreased sensitivity to praziquantel. **International Journal for Parasitology**. v.31. p.1093-1100. 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. IMMUNIZATION. Disponível em: <http://www.who.int/topics/immunization/en/>> em 31.04.2011

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

6 – CONCLUSÕES GERAIS

Em um recurso hídrico epidemiologicamente ativo são encontrados caramujos em diferentes fases de infecção, fezes recém eliminadas, ovos do parasito sem eclosão dos miracídios, miracídios recém eclodidos e cercárias recém eliminadas. Os resultados desse trabalho foram divididos por experimentos que apresentam de forma holística e simulatória o efeito da exposição da dose subletal do látex bruto de *E. milii* var. *hislopii* em diferentes fases do ciclo do *S. mansoni* neste ambiente. Com base nos resultados apresentados nos capítulos, pode-se concluir que:

- 1) Quando caramujos infectados, independente da fase de desenvolvimento do parasito intramolusco, entram em contato com a dose subletal do produto observamos alta mortalidade e redução na produção cercárias eliminadas pelos caramujos após a exposição;
- 2) O potencial infectivo dos miracídios foi afetado pela DL₅₀ do látex de *E. milii* var. *hislopii* quando esses eclodiram e infectaram o molusco, na presença do produto, promovendo assim, a redução significativa no número de cercárias eliminadas ao longo do tempo;
- 3) O potencial reprodutivo de *Biomphalaria glabrata* foi alterado devido à exposição ao látex tanto nos moluscos, infectados e não infectados, quanto na forma larval miracídio.
- 4) A dose subletal do látex de *E. milii* apresentou propriedade esquistossomicida, reduzindo a produção de vermes adultos e consequentemente o numero de ovos eliminados pelo hospedeiro definitivo no ambiente.
- 5) A propriedade moluscicida e esquistossomicida do produto em questão, viabilizada pela ação do mesmo nas formas infectantes e nos hospedeiros intermediários promove de forma concomitante e eficiente o controle da transmissão e da morbidade da doença. Um único produto, natural, biodegradável, em baixas doses, viável ecologicamente altera o desenvolvimento do ciclo do parasito nos hospedeiros intermediários e definitivos, gerando a redução de formas infectantes e a preservação das populações de moluscos em seu habitat natural.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMORIM, J.P. Infecção experimental e natural de murídeos pelo *Schistosoma mansoni* [nota prévia]. **Rev. bras. Malar.** v. 5. p. 219-22. 1953.

AUGUSTO, R. C. VIEIRA, G.F. VASCONCELLOS, M.C. MELLO-SILVA, C. C. C. RODRIGUES, M.L.A. Relationship between exposure eggs and miracidia of *Schistosoma mansoni* of the LD₅₀ *Euphorbia milii* var. *hislopii* latex and reproductive biology of infected *Biomphalaria glabrata*. **Biomédica.** v. 31(sup.3). p. 23-205. 2011.

BARBOSA, C.S.; FAVRE, T.C.; AMARAL, R.S.; PIERI, O.S. Epidemiologia e controle da esquistossomose mansoni. In: CARVALHO, O.S.; COELHO, P.M.Z.; LENZI, H.L. *Schistosoma mansoni: Uma visão multidisciplinar*. 1^oed. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz. p. 966-1008. 2008.

BARBOSA, F.S. Determination and control of schistosomiasis in Brazil: perspectives and control. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 90. p. 257-260. 1995.

BARBOSA, F. S.; CRUZ, O. J.; HOLLANDA, E.; SIQUEIRA, S. A. V.; CARVALHO, M. A. P.; GOMES, M. L.; ALMEIDA, A. S. Modelo alternativo para o controle da esquistossomose: estado atual do projeto no Estado do Espírito Santo, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública.** v. 9. p.85-8. 1993.

BARRETO, A. C.; PRATA, A. Dois anos de controle de molusco em uma área hiperendêmica de esquistossomose. **Gazeta Médica da Bahia.** v. 71. p. 95-102. 1971.

BAPTISTA, D.F.; VASCONCELLOS, M.C.; LOPES, F.E.F.; SILVA, I.P.; SCHALL, V.T. Evaluation of the molluscicidal properties of *Euphorbia splendens* var. *hislopii* (N.E.B.) (Euphorbiaceae) - 2. Investigation in lotic habitat. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 87. p. 549-553. 1992.

BERGQUIST, N.R.; LEONARDO, L.R.; MITCHELL, G.F. Vaccine-linked chemotherapy: can schistosomiasis control benefit from an integrated approach? **Trends Parasitol.** v.21. p. 112-117. 2005.

BINA, J.C. Specific therapy in the control of schistosomiasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 87 (Suppl. IV). p. 195-202. 1992.

CARVALHO, O.S., PASSOS, L.K.J., CALDEIRA, R.L. “Técnicas moleculares”. In: MS. *Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica- Diretrizes técnicas: Programa de Vigilância e controle da esquistossomose (PCE)*. Cap. 6, pp. 81-84. 2008.

COMBES, C. Where do human schistosomes come from? an evolutionary approach. **Trends Ecol. Evol.** v. 5. p. 324-337. 1990.

COURA, J.R.; AMARAL, R.S. Epidemiological and Control Aspects of Schistosomiasis in Brazilian Endemic areas. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 99. p.13-19. 2004.

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

DICKSON DESPOMMIER, D.; GWADZ, R.; HOTEZ,P.; KNIRSCH, C. Parasite Disease 5^oEd. ©Apple Tree Productions, LLC. Pub. P.O. Box280, New York. 2005.

DESPRE´ S, L., D. IMBERT-ESTABLET, and M. MONNEROT. Molecular characterization of mitochondrial DNA provides evidence for the recent introduction of *Schistosoma mansoni* into America. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 60. p. 221–23. 1993.

ENGELS, D.; CHITSULO, L.; MONTRESOR, A.; SAVIOLIET, L. The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. **Acta Tropica**, vol.82. p. 139-146. 2002.

EL-ANSARY, A.; MOHAMED, S.M.; MOHAMED, A.M. Induced changes in energy metabolism of *Biomphalaria alexandrina* snails using two potent plant molluscicides. **Bull. NRC. Egypt.** v. 26. p. 425-439. 2001.

FENWICK, A. New initiatives against Africa's worms. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v. 100. p. 200-207. 2006.

FENWICK, A.; WEBSTER, J. P. Schistosomiasis: challenges for control, treatment and drug resistance. **Current Opinion in Infectious Diseases.** v. 19. p. 577–582. 2006.

FENWICK, A.; WEBSTER, J. P.; BOSQUE-OLIVA, E.; BLAIR, L.; FLEMING, F. M.; ZHANG, Y.; GARBA, A.; STOTHARD, J. R.; GABRIELLI, A. F.; CLEMENTS, A. C.; KABATEREINE, N. B.; TOURE, S.; DEMBELE, R.; NYANDINDI, U.; MWANSA, J.; KOUKOUNARI, A. The Schistosomiasis Control Initiative (SCI): rationale, development and implementation from 2002–2008. **Parasitology.** v. 136. p. 1719–1730. 2009.

GAZZINELLI, M.F; GAZZINELLI, A; SANTOS, R.V; GONÇALVES, L.A.O. A interdição da doença: uma construção cultural da esquistossomose em área endêmica, Minas Gerais, Brasil. **Cadernos Saúde Pública.** v.18. p. 1628-38. 2002.

GRYSEELS, B. MBAYE, A.; DE VLAS, S. J.; STELMA, F. F.; GUISSSE, F. VAN LIESHOUT, L.; FAYE, D.; DIOP, M.; LY, A.; TCHUEM-TCHUENTE, L. A.; ENGLES, D.; POLMAN, K. Are poor responses to praziquantel for the treatment of *Schistosoma mansoni* infections in Senegal due to resistance? An overview of the evidence. **Tropical Medicine & International Health.** v. 6. p. 864-873. 2001.

GUIMARÃES, M.C.A. Avaliação do controle e vigilância do hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni*, no Vale do Ribeira, e observações do seu parasitismo. **Tese (doutor em Saúde Pública)**. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

HAAS W, GRABE K, GEIS C, PÄCH T, STOLL K, FUCHS M, HABERL B, LOY C. Recognition and invasion of human skin by *Schistosoma mansoni* cercariae: the key-role of L-arginine. **Parasitology**. v. 124. p. 153-16. 2002.

HAMED, M.A. Strategic control of schistosome intermediate host. **Asian Journal of Epidemiology**. v.3. p. 123-140. 2010.

HOTEZ, P.J., MOLYNEUX, D.H., FENWICK, A. KUMARESAN, J. SACHS, S.E., SACHS, J.D., SAVIOLI, L. Control of Neglected Tropical Diseases. **The new engl and journal of medicine**. v. 357. p. 1018-1027. 2007.

IOM, Institute Of Medicine. The causes and impact of neglected tropical and zoonotic disease: opportunities for integrated intervention strategies. Washinton, DC: The Nation Academic Press. 2011.

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

KAŠNÝ, M.; MIKEŠ, L.; DOLEČKOVÁ, K.; HAMPL, V.; DVOŘÁK, J.; NOVOTNÝ, M.; HORÁK, P. *Cathepsins B1 and B2 of Trichobilharzia Spp., Bird Schistosomes Causing Cercarial Dermatitis*. In: Robinson, M.W.; Dalton, J.P. [Cysteine Proteases of Pathogenic Organisms](#). 1^oed. Ed. Landes Bioscience. 2011.

KATZ, N; PEIXOTO, S.V. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansônica no Brasil. **Rev da Soc Bras de Med Tropical**, vol.33. p. 303-308. 2000.

KATZ, N. Terapêutica experimental da esquistossomose mansoni. In: CARVALHO, O.S.; COELHO, P.M.Z.; LENZI, H.L. **Schistosoma mansoni: Uma visão multidisciplinar**. 1^oed. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz. p. 966-1008. 2008.

KATZ, N. . Esquistossomose, Xistosa, Barriga d'água. **Ciência & Cultura**. v. 55. p. 652-656. 2003.

Lardans, V.; Dissous, C. Snail control strategies for reduction of schistosomiasis transmission. **Parasitol Today**. v. 14. p. 413-417. 1998.

LENZI, H.L.; PACHECO, R.G.; PELAJO-MACHADO, M.; PANASCO, M.S.; ROMANHA, W.S.; LENZI, J.A. Immunological system and *Schistosoma mansoni*: co-evolutionary immunobiology. What is the eosinophil role in parasite-host relationship? **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v. 92. p. 19-32. 1997.

LIMA, M.G. Análise fisiológica da ação do látex de *Euphorbia splendens var. hislopii* N.E.B (Euphorbiaceae) sobre *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (Pulmonata, Planorbidae) infectada por *Schistosoma mansoni* Sambom, 1907

(Trematoda, Schistosomatidae), associada ao tempo de degradação do látex. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2010.

LUTZ, A.; PENNA, O. Estudos sobre a schistosomose feitos no norte do Brasil por uma comissão do Instituto Oswaldo Cruz. Relatório e notas de viagem apresentadas. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 10.p. 83-94. 1918

MADUREIRA-PARÁ. The distribution of certain diseases in Brazil as indicate by data obtained through viscerotomy. I The incidence of *Schistosoma mansoni* lesions in material collected from 1937 to 1946. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 47. p. 521-534. 1949.

MALDONADO JR, 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 southeastern Brazil. **J. Helminthology.** v. 80, p. 369-375. 2006.

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

MELLO, R.S.; FERREIRA, A.R.S.; QUEIRO, M.M.C. Bioactivity of latex from *Euphorbia splendens* var. *hislopii* (Euphorbiaceae) on post-embryonic development of *Megaselia scalaris* (Phoridae). **Veterinary Parasitology.** v. 172. p. 100–104. 2010.

MELLO-SILVA, C.C. **Controle alternativo e alterações fisiológicas em *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), hospedeiro intermediário de *Schistosoma mansoni* Sambom,1907 pela ação do látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopii* N.E.B(Euphorbiaceae).**Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2005.

MELLO-SILVA, C.C.; VASCONCELLOS, M.C.; PINHEIRO, J.; RODRIGUES, M.L.A. Physiological changes in *Biomphalaria glabrata* say, 1818 (Pulmonata: Planorbidae) caused by sub-lethal concentrations of the latex of *Euphorbia splendens* var. *hislopii* N.E.B (Euphorbiaceae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 101. p. 3-8. 2006.

MELLO-SILVA, C.C.; VILAR, M.M.; BEZERRA, J.C.B.; BVASCONCELLOS, M.C.; PINHEIRO, J.; RODRIGUES, M.L.A. Reproductive activity alterations on the *Biomphalaria glabrata* exposed to *Euphorbia splendens* var. *hislopii* latex. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 102. p. 000-000. 2007.

MELLO-SILVA, C.C.; VILAR, M.M.; BVASCONCELLOS, M.C.; PINHEIRO, J.; RODRIGUES, M.L.A. Carbohydrate metabolism alterations in *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni* and exposed to *Euphorbia splendens* var. *hislopii* látex. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 105. p. 492-495. 2010.

MELLO-SILVA, C.C.; VILAR, M.M.; BEZERRA, J.C.B.; BVASCONCELLOS, M.C.; RODRIGUES, M.L.A.; PINHEIRO, J. The influence of exposure to *Euphorbia splendens* var. *hislopii* latex on the concentrations of total proteins and nitrogen products in *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni*.

Acta Trop. v. 117. p.101-104. 2011.

MODENA, C. M.; COELHO, P. M. Z.; BARBOSA, F. S.; LIMA, W. S. Transmission of *Schistosoma mansoni* under experimental conditions using the bovine – *Biomphalaria glabrata* – bovine model. **Rev. Ins. Med. Trop.** v.35. p. 11-16. 1993.

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

MURRAY, C.J.L.; LOPEZ, A.D. The Global Burden of Disease: a Comprehensive Assessment of Mortality and Disability from Diseases, Injuries and Risk Factors in 1990 and Projected to 2020 (Vols 1,2), **Harvard School of Public Health on be half of the WHO and the World Bank.** 1996.

NEVES, D.P. **Parasitologia dinâmica.** São Paulo: Atheneu, 2005.

OLDS, G.R.; KING, C.; HEWLETT, J.; OLVEDA, R.; WU, G. Double-blind placebo-controlled study of concurrent administration of albendazole and praziquantel in schoolchildren with schistosomiasis and geohelminths. **J. Infect. Dis.** v. 179. p. 996–1003. 1999.

OLIVEIRA-FILHO, E.C.; PAUMGARTTEN, F.J.R. Photodegradation of the molluscicidal latex of Crown-of-Thorns (*Euphorbia milli* var. *hislopii*). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 92. p. 657-659. 1997.

OLIVEIRA, T.F. **Prevenção da esquistossomose no contexto escolar: avaliação de um jogo educativo (Sumidouro, RJ).** Dissertação (Mestrado) - Fundação Oswaldo Cruz/ (FIOCRUZ), Rio de Janeiro. 2006.

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 Veterinárias). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2007.

OLLIARO, P.L.; VAILLANT, M.T.; BELIZARIO, V.J.; LWAMBO, N.J.S.; OULDABDALLAHI, M. A.; PIERI, O.S.; AMARILLO, M.L.; KAATANO, G.M.; DIAW, M.; DOMINGUES, A.L.C.; FAVRE, T.C.; LAPUJADE, O.; ALVES, F.; CHITSULO, L. Multicentre Randomized Controlled Trial of the Efficacy and Safety of Single-Dose Praziquantel at 40 mg/kg vs. 60 mg/kg for Treating Intestinal Schistosomiasis in the Philippines, Mauritania, Tanzania and Brazil. **PLoS Negl Trop Dis.** v. 5.p. 1-15. 2011.

OLSON, P.D.; CRIBB, T.H.; TKACH, V.V.; BRAY, R.A.; LITTLEWOOD, D.T.J. Phylogeny and classification of the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda) **International Journal for Parasitology.** v. 33 p. 733–755. 2003.

PAULINI, E.; DIAS, E. P. Resultados de três anos de controle da esquistossomose em Belo Horizonte (MG). **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais.** v. 24. p. 151-172. 1971.

PAULINI, E.; FREITAS, C.A.; AGUIRRE, G.H. Controlo f schistosomiasis in Brazil. In schistosomiasis: Proceedings of a symposium control, Ed.M.J. Miller, 104-110. New Orleans: Tulane University Press. 1972.

PELLÓN, A. B.; TEIXEIRA, I. Distribuição geográfica da esquistossomose mansônica no Brasil. Rio de Janeiro: Divisão da Organização Sanitária, 1950.

PICA-MATTOCCIA, L.; CIOLI, D. Sex-and stage-related sensitivity of *Schistosoma mansoni* to in vivo and in vitro praziquantel treatment. **International journal for parasitology**. v. 34. p. 527-533. 2004.

RAMOS, H.R. **Desenvolvimento e caracterização de uma vacina antiesquistossomose composta pela proteína Sm14 de *Schistosoma mansoni* utilizando a subunidade B da toxina colérica (CTB) como adjuvante**. Tese (doutorado em Ciências). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

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

RITCHTER, J. The impact f chemotherapy on morbidity due to schistosomiasis. **Acta Trop**. v. 86. p. 161-183. 2003.

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

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

SCHALL, V.T.; VASCONCELLOS, M.C.; ROCHA, R.S.; SOUZA, C.P.; MENDES, N.M. The control of the schistosome-transmitting snail *Biomphalaria glabrata* by the plant molluscicide *Euphorbia splendens* var. *hislopii* (syn *milli* Des Moul): a longitudinal field study in an endemic area in Brazil. **Acta Trop**. v. 79. p.165-170. 2001.

SHIFF, C.J.; CLARKE, V.V.; EVANS, A.C.; BARNISH, G. "Molluscicide for the control of schistosomiasis in irrigation schemes. A study in Southern Rhodesia," **BULLETIN OF THE WORLD HEALTH ORGANIZATION**, 48:299-307. 1973.

SILVA, J.R.M.C.; NEVES, R.H.; GOMES, D.C. Filogênia, co-evolução, aspectos morfológicos e biológicos das diferentes fases de desenvolvimento do *Schistosoma mansoni*. In: CARVALHO, O. S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. **Schistosoma mansoni & esquistossomose: uma visão interdisciplinar**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ. p. 823-847. 2008.

SIMÕES, M.C.M. **Detecção de polimorfismo de base única em etiquetas de seqüências expressas de *Schistosoma mansoni***. Dissertação (mestrado em Ciências).

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU. Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde. 2005.

SINGH, D. K.; AGARWAL, R. A. Correlation of the anticholinesterase and molluscicidal activity of the latex of the *Euphorbia royleana* Bioss on *Lymnaea acuminata*. **J Natural Products**. v. 47. p. 702-705.1984.

SINGH, SK; YADAV, RP; SINGH, A. molluscicides from some common medicinal plants of eastern Uttar Pradesh, India. **J. Appl. Toxicol**, v. 30, p. 1-7. 2010.

SOUZA, C. A.; DE CARVALHO R. R.; KURIYAMA S.N.; ARAÚJO, I.B. RODRIGUES, R.P.; VOLLMER, R.S.; ALVES, E.M. & PAUMGARTTEN, F.J.R. Study of the embriofeto-toxicity of “crow of thorns” (*Euphorbia milli* var *hislopii*) latex, a natural molluscicide. **Braz J. Med Biol. Res.** v. 30. p. 1325-1332. 1997.

TAKOUGANG, I.; MELI, J.; ANGWAFO, F. Field trials of low dose Bayluscide on snail hosts of schistosome and selected non-target organisms in sahelian Cameroon. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 101. p. 355-358. 2006.

TELES, H.M.S.; CARVALHO, O.S. Implicações da biologia de biomphalaria no controle da esquistossomose. In: CARVALHO, O.S.; COELHO, P.M.Z.; LENZI, H.L. **Schistosoma mansoni: Uma visão multidisciplinar**. 1ºed. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz. p. 966-1008. 2008.

THE LANCET, [Volume 368, Issue 9550](#), Pages 1865 - 1866, 25 November 2006.

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

VASCONCELLOS, M.C.; SCHALL, V.T. Latex of “Coroa de Cristo” (*Euphorbia splendens*): an effective molluscicide. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 81. p. 475-476.1986.

WEBBE, G. Moluscicides in the control of schistosomiasis. In: Plant molluscicides. 1ºed. UNDP/WORLD BANK/WHO. Special programme for research and training in tropical diseases. 1985.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). WHO expert committee on Bilharziasis: first report. Geneva: Technical report series: 65, 1953.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Schistosomiasis control. Geneva: WHO, 1973.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). The control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis: report of a WHO Expert Committee. Geneva: WHO, 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Report and control of schistosomiasis and the*

soil-transmitted helminthiasis. Geneva: World Health Organization, 2002.

World Health Organization. Department of Measurement and Health Information. February. 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global plan to combat neglected tropical diseases. p. 2008–2015. 2007.

World Health Organization. Immunization. Disponível em: <http://www.who.int/topics/immunization/en/> 31.04.2011.

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

ZAMITH, H.P.S.; PAUMGARTTEN, F.J.R.; SPEIT, G. Evaluation of the mutagenicity of the molluscicidal latex of information on the chemical used as active components of pesticides. **British Crop Protection Council**, 383 p. 1996.

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

8 – ANEXO

Produção científica no período acadêmico

Resumos apresentados em congressos nacionais

AUGUSTO, R.C.; MELLO-SILVA, C.C.; RODRIGUES, M.L.A. Influence of cercarial patterns in experimental designs to control of transmission of schistosomiasis. XVI Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária. Mato Grosso do Sul-MS. Livro de Resumos. 2010.

AUGUSTO, R.C.; MELLO-SILVA, C.C.; RODRIGUES, M.L.A. Interference of calcium carbonate in the cercarie production of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*. XVI Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária. Mato Grosso do Sul-MS. Livro de Resumos. 2010.

AUGUSTO, R. C.; VIEIRA, G.F.; VASCONCELLOS, M.C.; MELLO-SILVA, C. C. C.; RODRIGUES, M.L.A. A relação entre a exposição de ovos e miracídios de *Schistosoma mansoni* pela DL₅₀ do látex de *Euphorbia milii* (syn. *splendens*) var. *hislopii* e a biologia reprodutiva de *Biomphalaria glabrata* infectada. Anais do XXII Congresso Brasileiro de Parasitologia. São Paulo-SP. 2011.

AUGUSTO, R. C.; RODRIGUES, M.L.A.; MELLO-SILVA, C. C. C. Ação da dose sub-letal (DL₅₀) do moluscicida *Euphorbia milii* (Syn. *splendens*) var. *hislopii* em *Biomphalaria glabrata* infectada por *Schistosoma mansoni*. Anais do VI Fórum de Pós-Graduação da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Rio de Janeiro-RJ. 2011.

AUGUSTO, R. C.; VIEIRA, G.F.; LIMA, U.M.; MELLO-SILVA, C. C. C. Estudo da biologia reprodutiva de *Biomphalaria glabrata* (SAY, 1818) Infectada por *Schistosoma mansoni* em auto-fecundação. Anais do I Simpósio de Parasitologia da FFP-UERJ. Rio de Janeiro-RJ. 2011.

- Apresentação oral:

AUGUSTO, R. C.; MELLO-SILVA, C.C.; RODRIGUES, M. L. A. Avaliação da influência do látex aquoso de *Euphorbia splendens* var. *hislopii* (EUPHORBIACEAE) sobre o ciclo biológico de *Schistosoma mansoni* (TREMATODA, SCHISTOSOMATIDAE) em condições laboratoriais. Anais do V Fórum de Pós-Graduação da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 2010. Apresentação Oral.

AUGUSTO, R. C. Gerenciamento de Resíduos Químicos no Laboratório de Esquistossomose Experimental. I Encontro de Alunos e Ex-alunos do Curso de Biossegurança em Laboratório de Pesquisa Biomédica do Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro-RJ. 2011. Apresentação Oral.

Resumos em congressos internacionais

AUGUSTO, R.C.; PINTO, P.M.; MELLO-SILVA, C.C. Process management aiming the improvement of *Biomphalaria glabrata* colony maintenance at molluscário of Experimental Schistosomiasis Laboratory, IOC, Fiocruz. XII International Symposium on Schistosomiasis. Rio de Janeiro-RJ. 2010.

LIMA, M.G.; AUGUSTO, R.C.; VASCONCELLOS, M.C.; MELLO-SILVA, C.C.; PINHEIRO, J. The molluscicidal action of the latex of *Euphorbia splendens* var. *hislopii* and the *Schistosoma mansoni* infection on the concentrations of total proteins and nitrogen products in *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni* during latex solution. XII International Symposium on Schistosomiasis. Rio de Janeiro-RJ. 2010.

LIMA, M.G.; AUGUSTO, R.C.; MELLO-SILVA, C.C.; PINHEIRO, J. Carbohydrate metabolism in *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni* and exposed to latex from *Euphorbia splendens* var *hislopii* during its degradation. XII International Symposium on Schistosomiasis. Rio de Janeiro-RJ. 2010.

- apresentação oral

AUGUSTO, R. C. VIEIRA, G.F. VASCONCELLOS, M.C. MELLO-SILVA, C. C. C. RODRIGUES, M.L.A. Relationship between exposure eggs and miracidia of *Schistosoma mansoni* of the LD₅₀ *Euphorbia milii* var. *hislopii* latex and reproductive

biology of infected *Biomphalaria glabrata*. XX Congresso Latinoamericano de Parasitología y XV Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical. Biomédica. v. 31(sup.3). p. 23-205. 2011. Apresentação Oral.

- Mini Curso ministrado:

AUGUSTO, R. C. MELLO-SILVA, C. C. C. Técnicas de Diagnóstico Coproparasitológico. I Simpósio de Parasitologia da Faculdade de Formação de Professores, FFP/UERJ. Rio de Janeiro-RJ. 2011. (Curso de curta duração ministrado/Extensão).

- Trabalhos Técnicos:

AUGUSTO, R. C. MELLO-SILVA, C. C. C. Apostila de Técnicas Coproparasitológicas para o Diagnóstico de Parasitos de Importância Médica e Veterinária. I Simpósio de Parasitologia da Faculdade de Formação de Professores, FFP/UERJ. Rio de Janeiro-RJ. 2011. (Desenvolvimento de material didático ou instrucional - Apostila).

AUGUSTO, R.C. Análise dos conhecimentos em Parasitologia e sua influência na visão de Saúde Pública do Biólogo formado pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Monografia de Licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 2010.

AUGUSTO, RC. Impactos da Gestão do Processo na Colônia de *Biomphalaria Glabrata* Mantida no Laboratório de Esquistossomose Experimental, IOC/FIOCRUZ. Monografia de Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 2011.

Artigos submetidos à publicação:

AUGUSTO, R.C.; RODRIGUES, M.L.A.; MELLO-SILVA, C.C. Educação na área médica e representação ambiental no controle da esquistossomose mansônica no Brasil. Revista de Ciência & Tecnologia. Aceito para publicação

AUGUSTO, R.C.; MAGALHÃES, A.C.S.; MELLO-SILVA, C.C. Fitness of population of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca, Planorbidae) infected of *Schistosoma mansoni* under laboratory conditions. *Revista de Patologia Tropical*.

LIMA, M.G. AUGUSTO, R.C. VASCONCELLOS, M.C. MELLO-SILVA, C. C. C. PINHEIRO, J. Changes in Carbohydrate Metabolism of *Biomphalaria glabrata* Infected with *Schistosoma mansoni* as a Function of Biodegradation of Latex of *Euphorbia milli* (syn. *splendens*) var. *hislopii*. *Acta Tropica*

LIMA, M.G. AUGUSTO, R.C. VASCONCELLOS, M.C. MELLO-SILVA, C. C. C. PINHEIRO, J. Changes in Concentrations of Total Proteins and Nitrogen Products of *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni* as a Function of Biodegradability of the latex of *Euphorbia milli* (syn *splendens*) var. *hislopii*. *Journal of Parasitology*.

Artigos Publicados

MAGALHÃES, A.C.S. AUGUSTO, R.C.; MELLO-SILVA, C.C. *Biomphalaria glabrata*: Exposure Different Amounts of Calcium Carbonate Influencing Growth, Sexual Maturation and Pearl's Formation. *Revista de Patologia Tropical*. v. 40. p. 341-347. 2011.

Patente

Ação Esquistossomicida da Dose Sub-Letal do Extrato Aquoso do Látex de *Euphorbia Mili* var. *hislopii* Para o Controle da Transmissão da Esquistossomose Mansônica. Núcleo de Inovação Tecnológica, NIT/ IOC/ FIOCRUZ. Processo SG129/11.

Orientação

Uberlândia de Lima Monteiro. Estudo da biologia reprodutiva de *Biomphalaria glabrata* infectada por *Schistosoma mansoni* em auto-fecundação. Orientação de outra natureza. Programa de Vocação Científica, PROVOC. Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). 2011.Co-orientador

Docência

Durante o primeiro período de 2010 realizou atividade docente na disciplina de Parasitologia II, no curso de Medicina Veterinária do Departamento de Parasitologia Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFFRJ) e no segundo semestre do ano de 2010 realizou atividade docente na disciplina de Zoologia Aplicada II, ministrada no curso de Zootecnia, do Departamento de Parasitologia Animal da UFFRJ.