



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

MESTRADO

**Avaliação morfológica da placenta do *Holochilus scireus*
naturalmente infectado pelo *Schistosoma mansoni***

GABRIEL GOMES LEÔNIO

SÃO LUÍS – MA

2021

GABRIEL GOMES LEÔNCIO

Avaliação morfológica da placenta do *Holochilus scireus* naturalmente infectado pelo *Schistosoma mansoni*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Abreu Silva

SÃO LUÍS – MA

2021

GABRIEL GOMES LEÔNCIO

Avaliação morfológica da placenta do *Holochilus scireus* naturalmente infectado pelo *Schistosoma mansoni*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Aprovada em: 17/05/2021

BANCA EXAMINADORA

Profa Dra. Ana Lucia Abreu Silva (Orientador)
Universidade Estadual do Maranhão

Profa.Dra. Joicy Cortez
Universidade CEUMA

Prof. Dr. Neuton da Silva
Universidade Estadual do Maranhão

Profa. Dra. Maria do Desterro Soares Brandão
Universidade Federal do Maranhão

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

GOMES LEÔNCIO, GABRIEL.

Avaliação morfológica da placenta do *Holochilus scireus* naturalmente infectado pelo *Schistosoma mansoni* / GABRIEL GOMES LEÔNCIO. - 2021.

55 f.

Orientador(a): Ana Lúcia Abreu-Silva.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, SÃO LUÍS, 2021.

1. *Holochilus scireus*. 2. Placenta. 3. *Schistosoma mansoni*. I. Abreu-Silva, Ana Lúcia. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus em primeiro lugar por tudo.

A minha orientadora Professora Dra. Ana Lúcia

As Biólogas: Ranyelle e Gabriele

A aluna Thaís Rafisa

Universidade Federal do Maranhão.

Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde.

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- CAPES.

LISTA DE SIGLAS DE ABREVIATURA

LM - Lacunas Maternas

M - camada mesotelial

SVP - Células que compõem o saco vitelino parietal

SZ - Zona de espongiotrofoblastos

VS - vasos sanguíneos

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Avaliações biométricas das fêmeas de <i>Holochilus sciureus</i>.....	26
---	-----------

LISTA DE FOTOS

Foto 1: Placentas gravídicas em diferentes fases.....	28
Foto 2: Ovo de <i>S. mansoni</i> identificado em fezes de <i>H. sciureus</i> pelo método Kato-katz	29
Foto 3: Histologia da placenta.....	31
Foto 4 : Visão geral da placenta no final da gestação.....	32
Foto 5: Microscopia Eletrônica de varredura da placenta de <i>Holochilus brasiliense</i>	33
Foto 6: Microscopia Eletrônica de Transmissão da placenta de <i>Holochilus brasiliense</i> .	34

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Esquistosomose aspectos gerais	14
2.2 Esquistosomose no Brasil	15
2.3 O reservatório natural do <i>Schistosoma mansoni</i>	16
2.4 São Bento: Baixada maranhense	18
2.5 A placenta dos roedores x placenta humana	19
2.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão e Varredura	21
3 OBJETIVOS	23
3.1 Geral	23
3.2 Específico	23
4 MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1 Área de estudo	23
4.2 Captura de roedores	23
4.3 Análises biométricas	24
4.4 Análise da positividade para <i>S.mansoni</i> nos roedores	24
4.5 Análises Histológicas e Ultraestruturais	25
5 RESULTADOS E DISCURSÃO	26
6 CONCLUSÃO	35
ANEXOS	36
ANEXO I: Parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal -CEEA	37
ANEXO II: Licença SISBIO.....	39
ANEXO III: Manuscrito Submetido (Revista Placenta).....	40
REFERÊNCIAS	43

RESUMO

A esquistossomose é uma parasitose causada pelo trematódeo *Schistosoma mansoni*. Segundo o Ministério da Saúde, a esquistossomose no Maranhão é endêmica em mais de 20 municípios. A transmissão dessa parasitose ocorre por meio do contato com coleções de água doce, contaminadas por ovos de *S. mansoni*, onde também estejam presentes os hospedeiros intermediários (caramujos do gênero *Biomphalaria*). Tendo em vista a semelhança entre a placenta dos roedores e a placenta humana (discoidal hemocorial), aliada a falta de literatura científica existente, este trabalho teve por objetivo caracterizar histologicamente a placenta de roedores *Holochilus* sp naturalmente infectados por *Schistosoma mansoni* que habitam na Baixada Maranhense. Foram avaliados no período de setembro de 2019 a março de 2020 um total de 13 fêmeas da espécie *Holochilus scireus*, das quais quatro encontravam-se em diferentes estágios de gestação. Os roedores do gênero *Holochilus* sp encontrados mostraram-se no estudo suscetíveis à infecção por *S. mansoni*. Sendo que neste trabalho podemos concluir que a placenta do roedores do gênero *Holochilus* sp apresenta-se de forma semelhante a humana, porém do ponto de vista da transmissão vertical observou-se que a placenta cumpre seu papel no de preservação e proteção fetal.

Palavras- chaves: *S. Mansoni*, *Holochilus* sp, Caracterização histológica

ABSTRACT

Schistosomiasis is a parasitosis caused by the trematode *Schistosoma mansoni*. According to the Ministry of Health, the schistosomiasis in Maranhão is endemic in more than 20 municipalities. The transmission of this parasitosis occurs through contact with fresh water collections, contaminated by *S. mansoni* eggs, where intermediate hosts (snails of the genus *Biomphalaria*) are also present. In view of the similarity between the rodent placenta and the human (hemocorial discoid) placenta, combined with the lack of existing scientific literature, this study aimed to histologically characterize the rodent placenta *Holochilus* sp naturally infected by *S. mansoni* that inhabit the Baixada Maranhense. From September 2019 to March 2020, a total of 13 females of the species *H. scireus* were evaluated, of which 4 were in different stages of pregnancy. The rodents of the genus *Holochilus* sp found in the study were susceptible to infection by *S. mansoni*.

Keywords: S. Mansoni, Holochilus sp, Histological characterization

1 INTRODUÇÃO

As doenças parasitárias são reconhecidas como um problema de saúde pública e atingem milhares de pessoas em todo mundo, entre as quais destaca-se a esquistossomose, doença resultante de uma teia de relações entre o homem, o ambiente aquático e o helminto *Schistosoma* sp (MINISTÉRIO DA SAÚDE 2017). É endêmica em aproximadamente 76 países, com prevalência nas regiões tropicais e subtropicais. Apesar dos esforços, a doença continua tendo alta morbidade, afetando aproximadamente 200 milhões de pessoas ao redor do mundo, com 85% dos casos relatados na África. Em se tratando do Brasil, estima-se que 8 milhões de pessoas estejam infectadas, atingindo quase todos os estados brasileiros, principalmente regiões nordeste, sudeste e centro-oeste (SAMPAIO et al., 2017).

Desde a década de 1980, o Programa de Controle da Esquistossomose (PCE) desenvolve inquéritos coprológicos e outras ações com recursos do governo federal com o objetivo de controlar a doença em todo o país (COURA, 2004). A partir de 1998, os municípios passaram a ser responsáveis pelas atividades de vigilância e controle dessa parasitose, tais municípios devem dispor de uma estrutura capaz de proporcionar o desenvolvimento dessas ações de forma integrada, tanto em ações de vigilância epidemiológica, ambiental e controle da doença, além de realizarem um diagnóstico integral da situação da saúde de cada município do Brasil (BRASIL, 2007)

A transmissão da esquistossomose ocorre devido ao contato com águas contaminadas por cercárias, a forma larvar do parasito (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Rotineiramente nos locais endêmicos, as pessoas utilizam rios habitados por caramujos infectados pelo *S. mansoni* para banhos, pescas, lavagem de roupa e louças, tornando-se suscetíveis à doença (COUTO, 2005).

A esquistossomose pode ser confundida com outras doenças devido às variadas manifestações clínicas que ocorrem, sendo a forma aguda comumente observada em pessoas que não vivem em áreas endêmicas. O exame parasitológico de fezes para diagnóstico dessa parasitose é realizado principalmente por meio dos métodos de sedimentação espontânea, entretanto

Kato-Katz é o método padrão ouro preconizado pelo Ministério da Saúde em regiões endêmicas (VITORINO, 2012)

No estado do Maranhão esta parasitose é notificada em 49 dos 217 municípios existentes. Nas Zonas do Litoral Norte e na Baixada Maranhense estão os focos mais antigos, com as prevalências mais elevadas. Em 2010, a prevalência do estado foi mais de 69 mil casos registrados nesses municípios (BRASIL, 2012)

Acredita-se que a esquistossomose é mantida não só pela participação humana, mas também com o auxílio de roedores silvestres do gênero *Holochilus*. Estes animais são comumente encontrados nesta área e, geralmente, apresentam alta carga parasitária, podendo eliminar suas fezes com ovos viáveis do parasito em ambientes aquáticos onde estão presentes os caramujos vetores (SOUZA, 2008).

Os roedores do gênero *Holochilus*, pertencem sistematicamente à ordem *Rodentia*, família *Cricetidae* e subfamília *Sigmodontinae*. Os cricetídeos estão distribuídos geograficamente por toda América do Sul (MIRANDA, 2015). No Brasil ocorre desde estado do Espírito Santo ao nordeste do Rio Grande do Sul, atingindo partes do estado de Minas Gerais (BONVICINO, 2015).

Na Baixada Ocidental Maranhense, Bastos et al.(1984) constataram a coabitação de dois hospedeiros definitivos do *S. mansoni*: o ser humano e o roedor silvestre do gênero *Holochilus*. Sabe-se que o roedor *Holochilus sp* é um importante elo da cadeia epidemiológica do *S. mansoni*, funcionando como um possível reservatório natural, não só por albergar grande número de parasitos adultos, mas também por eliminar ovos maduros em suas fezes durante todo o ano, destacando-se por serem importantes na manutenção da helmintíase na região (GENTILE, et al, 2010).

Além disso, a Baixada Maranhense é considerada como uma área endêmica para a esquistossomose, caracterizando-se também pela falta de saneamento básico adequado, concentração populacional e coleções hídricas contendo grande número de caramujos suscetíveis à infecção, com predomínio das espécies *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria straminea* (CANTANHEDE,

2014). Os espécimes de roedores do gênero *Holochilus* são animais terrestres, predominantemente noturnos, de hábitos semi-aquáticos, dotados de pequenas membranas interdigitais que auxiliam na locomoção dentro d'água, sendo, portanto, perfeitamente capazes de se adaptarem à ecologia da Baixada Maranhense, a qual apresenta um período estacional seco e um chuvoso (OZAN, 2015).

O ciclo reprodutivo de *Holochilus sp.* é semelhante ao de outros pequenos mamíferos da região tropical, e se sabe que o período fértil das fêmeas dura cerca de quatro dias e os animais estão aptos para o acasalamento com três meses de vida. A gestação dura em média 21 dias com aproximadamente 5 a 10 filhotes por ninhada (BONVIVINO, 2015). Os roedores costumam fazer ninhos em restos de madeira ou, principalmente, nos empilhamentos entre as linhas da vegetação aquática, onde se protegem dos predadores e costumam construir seus ninhos elipsoidais, com média de 22,5 cm de comprimento, 13 cm de largura e 18,7 cm de altura (SAUTHIER, 2010).

Desta forma, mais informações sobre o mecanismo de infecção do *S. mansoni* e a sua transmissão para os filhotes torna-se necessário para o estabelecimento de medidas profiláticas e educativas para diminuição dos casos no interior do estado do Maranhão.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Esquistossomose aspectos gerais

A esquistossomose é uma doença tropical negligenciada (DTN) causada pelo parasito esquistossomoma, principalmente *S. mansoni*, que está associado a desnutrição a longo prazo, anemia, problemas em órgãos internos, resultando na morte dos pacientes infectados e não tratados na fase inicial da doença. Em todo o mundo 190 milhões de pessoas apresentam a esquistossomose, com mais de 70 milhões de novos casos e milhares de mortes registradas anualmente (GBD, 2017).

É uma parasitose de veiculação hídrica, causada pelo trematódeo *Schistosoma mansoni*, que tem no seu ciclo biológico o envolvimento de caramujos do gênero *Biomphalaria*, sendo esses os únicos hospedeiros

intermediários, e tem o homem como hospedeiro definitivo. Essa doença é conhecida popularmente como "doença do caramujo" ou "barriga d'água", que cursa com um quadro agudo ou crônico, muitas vezes com poucos sintomas ou assintomático, mas pode também se manifestar com formas mais graves, com desfecho do óbito do hospedeiro (MELO et al.,2011)

A esquistossomose está classificada entre as enfermidades tropicais negligenciadas e é considerada como a segunda doença parasitária mais importante, constituindo um dos principais problemas de saúde pública mundial (BRASIL., 2013). Estatísticas globais demonstram que aproximadamente 250 milhões de indivíduos estão infectados por alguma das espécies do gênero *Schistosoma* e, destes, 120 milhões apresentam os sintomas clínicos e 20 milhões a doença grave. Esta helmintíase é endêmica em 78 países e em média 780 milhões de indivíduos estão sob risco de adquirir a infecção, sendo a maioria crianças (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2014).

O parasito *Schistosoma* é considerado um platelminto pertencente à família *Shistossomatidae*, da classe dos trematódeos, que apresentam dimorfismo sexual nítido e ciclo heteroxênico. Dentre o gênero *Schistosoma* sp. seis espécies diferentes de parasitos infectam seres humanos: *S. mansoni* em países como África, Arábia e América do Sul, *S. haematobium*, na África e Arábia, *S. japonicum* encontrado na China e Sul Asiático, *S. intercalatum* no Oeste e Centro da África, *S. mekongi* na Bacia do Rio Mekong na Ásia e *S. malayensis* na Malásia. *S. japonicum*, *S. haematobium* e *S. mansoni* são os três principais agentes etiológicos da esquistossomose humana, com distribuição geográfica diferente (ARANTES, 2016).

Em geral, as espécies que infectam o homem são facilmente identificadas através do tamanho e morfologia do ovo, a origem geográfica do isolado e a especificidade pelo hospedeiro intermediário (HOPE, 1993). Os ovos de *S. mansoni* possuem uma espinha lateral, os ovos das espécies *S. haematobium* e *S. intercalatum* possuem espinha terminal, enquanto a espécie *S. japonicum* possui ovos sem espícula. Das várias espécies conhecidas de *Schistosoma*, sabe-se que *S. mansoni* é a espécie com maior distribuição global e a única espécie causadora da esquistossomose no Brasil

(BERGQUIST 2002). Os principais manifestações clínicas da doença são: febre, dor de cabeça, apatia por hepatoesplenomegalia, podendo até causar a morte (VAN et al.,2003)

2.2 Esquistossomose no Brasil

No Brasil, a doença foi descrita em 18 estados e no Distrito Federal, sendo que sua ocorrência está diretamente ligada à presença dos moluscos transmissores. Os estados das regiões Nordeste, Sudeste e Centro-oeste são os mais afetados. Estima-se que cerca de 25 milhões de pessoas vivem em áreas sob o risco de contrair a doença.

A doença é detectada em todas as regiões do país, as áreas endêmicas e focais abrangem 19 unidades federadas, sendo os estados mais atingidos os estados: Alagoas, Bahia, Pernambuco, Rio Grande do Norte (faixa litorânea), Paraíba, Sergipe, Espírito Santo e Minas Gerais (com predominância no norte e nordeste do estado). No Pará, Maranhão, Piauí, Ceará, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás e no Distrito Federal (HAMS,2013).

De acordo do Ministério da Saúde (MS), entre 2010 e 2012 ocorreram 941 internações e 1.464 óbitos por esquistossomose no mesmo período de tempo no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE , 2014).

No estado do Maranhão, a presença dessa parasitose é conhecida desde 1920, constituindo-se um grave problema no contexto de saúde pública e apresentando focos em diversas regiões do Estado. Essa doença apresenta caráter endêmico, especialmente na região da Baixada Ocidental Maranhense, onde, segundo o Sistema de Informação sobre Esquistossomose, são encontradas localidades com altas prevalências em humanos, como é o caso do município de São Bento (6,12% no ano de 2010; 6,48% em 2011) , e também em hospedeiros não humanos (BASTOS,1984).

No entanto, o tratamento da esquistossomose é baseado em apenas um medicamento, o praziquantel (PZQ), que tem um efeito limitado nas lesões já desenvolvidas no fígado e no baço (E.M et al.;2018).

Fatores biológicos, demográficos, socioeconômicos, políticos e culturais compõem os fatores de risco para a transmissão da doença e têm contribuído para a formação de quadros endêmicos. A precariedade do saneamento básico, o destino dos resíduos e o contato com coleções hídricas contaminadas são determinantes para o aumento da prevalência e endemia (CUNHA,2012).

O controle da esquistossomose é uma das tarefas mais difíceis dos serviços de Saúde Pública. A importância da doença não se restringe somente a da prevalência e larga distribuição geográfica no mundo. Ela diz respeito, também, ao mecanismo de escape do molusco frente ao moluscicida, Além disso, há de se considerar a inexistência de mecanismos naturais de defesa imunológica, bem como de uma vacina efetiva (AMARAL,2006)

A transmissão da esquistossomose no Brasil depende da presença de três espécies de caramujo do gênero *Biomphalaria*: *Biomphalaria glabrata*; *Biomphalaria tenagophila*; e *Biomphalaria straminea*. Pelo menos uma das três espécies já foi notificada em 25 das 27 unidades federadas do país. Esses moluscos encontram-se em regiões onde há coleções de água doce, como, por exemplo, barragens, áreas de irrigação, rios, lagos, lagoas e brejo (RESENDE, 2005).

O programa de controle da esquistossomose, implantado no Brasil entre 1976 e 1993, resultou em significativa redução da prevalência da doença e também da incidência de formas graves, no entanto, foi observado o surgimento de novos focos. Investigações mais aprofundadas são necessárias para que se possa verificar se a redução na prevalência da esquistossomose em áreas endêmicas representa realmente uma redução no número de indivíduos infectados. Ou, por outro lado, se simplesmente reflete uma diminuição na carga parasitária dos indivíduos das áreas tratadas, dificultando sua identificação pelos métodos diagnósticos disponíveis atualmente (VIEIRA,1993).

2.3 O reservatório natural do *Schistosoma mansoni*

A patogenia da esquistossomose tem sido estudada experimentalmente utilizando-se como hospedeiros definitivos os roedores. MOORE et.al, em (1949) estudaram a susceptibilidade de vários mamíferos, utilizados em pesquisas laboratoriais, ao *Schistosoma mansoni* e concluíram

que os roedores se constituíam nos hospedeiros definitivos mais satisfatórios, pois desenvolviam vermes adultos sexualmente maduros, além de eliminarem ovos viáveis do parasito nas fezes a partir da 6.^a semana, após a infecção por cercárias do trematódeo.

Os quadros patológicos resultantes da infecção por *S. mansoni*, nestes pequenos mamíferos se assemelha bastante ao observado no homem portador de esquistossomose mansônica, evoluindo para hepatoesplenomegalia (STIREWALT, et.al, 1951)

Os roedores do gênero *Holochilus*, pertencem sistematicamente à ordem Rodentia, família *Cricetidae* e subfamília *Sigmodontinae*. Os cricetídeos estão distribuídos geograficamente por toda América do Sul (MYERS, 2000). No Brasil ocorre desde estado do Espírito Santo ao nordeste do Rio Grande do Sul, atingindo partes do estado de Minas Gerais (BONVICINO, 2008).

No Maranhão esses roedores podem ser encontrados na região da baixada ocidental maranhense, localizando-se na porção noroeste do estado, entre as coordenadas 01° 59' - 4° 00' S e 44° 21' – 45° 33' W. Essa localidade é considerada uma das regiões economicamente mais pobres do estado, com a população sobrevivendo à custa dos lagos naturais, da pesca, da caça, lavoura e pecuária de pequeno porte. Além de ser uma área endêmica para esquistossomose, sendo considerado um dos focos mais antigos do Maranhão (BASTOS, 1984).

Os espécimes de roedores do gênero *Holochilus* são animais terrestres, predominantemente noturnos, de hábitos semiaquáticos, dotados de pequenas membranas interdigitais que auxiliam na locomoção dentro da água, sendo, portanto, perfeitamente capazes de se adaptarem à ecologia da Baixada Maranhense, a qual apresenta um período estacional seco e um chuvoso (OZANAN, 1969).

O ciclo reprodutivo de *Holochilus* sp. é semelhante ao de outros pequenos mamíferos da região tropical, e se sabe que o período fértil das fêmeas dura cerca de quatro dias e os animais estão aptos para o acasalamento com três meses de vida. A gestação dura em média 21 dias com aproximadamente 5 a 10 filhotes por ninhada (GENTILE, 2010).

Os roedores costumam fazer ninhos em restos de madeira ou, principalmente, nos empilhamentos entre as linhas da vegetação aquática, onde se protegem dos predadores e costumam construir seus ninhos elipsoidais, com média de 22,5 cm de comprimento, 13 cm de largura e 18,7 cm de altura (SAUTHIER, 2010).

2.4 São Bento: Baixada Maranhense

O município de São Bento teve sua autonomia política em 29/04/1835, está inserido na Mesorregião Norte Maranhense, dentro da Microrregião Baixada Maranhense abrangendo uma área de 459 km², com uma população de aproximadamente 60.736 habitantes e densidade demográfica de 90,74 habitantes/km² (IBGE 2018).

Limita-se ao Norte com os municípios de Bacurituba e Peri Mirim; ao Sul com os municípios de São Vicente Ferrer; a Leste como município de Cajapió e a Oeste com os municípios de Palmeirândia, Pinheiro e Pedro do Rosário. Cerca de 57,7% da população reside na zona urbana, sendo que a incidência de pobreza no município é de 54,42% e o percentual dos que estão abaixo do nível de pobreza é de 44,66% (IBGE,2019)

Na educação, destacam-se os seguintes níveis escolares em São Bento: Educação Infantil, creche e pré-escolar (12,57%); Educação de Jovens e Adultos (11,08%); Educação Especial (0,63%); Ensino Fundamental, 1º ao 9º ano (58,83%); Ensino Médio, 1º ao 3º ano (16,88%). O analfabetismo atinge mais de 22% da população da faixa etária acima de 07 anos (IMESC, 2010).

No campo da saúde, a cidade conta com 17 estabelecimentos públicos de atendimento. No censo de 2000, o Estado do Maranhão teve o pior Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) do Brasil e São Bento obteve baixo desempenho, com IDH de 0,592

O clima da região, segundo a classificação de Köppen, é tropical úmido com dois períodos bem definidos: um chuvoso, que vai de janeiro a junho, com médias mensais superiores a 255 mm e outro seco, correspondente aos meses de julho a dezembro. Dentro do período de estiagem, a precipitação pluviométrica varia de 6,8 a 83,9 mm e no período chuvoso varia 135,9 a 351,8 mm, com média anual em torno de 1.767 mm (FREITAS, 2013)

As regiões de baixadas são alagadas durante o período chuvoso, formando lagos interligado, esses fazem parte da bacia hidrográfica do Pindaré e a vegetação é composta por Floresta Ombrófila e por formação vegetal com influência marinha e Flúvio-Marinha.

2.5 A placenta dos roedores x placenta humana

A placenta se forma em função do sucesso da implantação do blastocisto no útero, representando o órgão funcional da unidade biológica materno-fetal. É, tanto do ponto de vista morfológico como funcional, um órgão muito complexo, que no seu desenvolvimento apresenta não somente modificações quantitativas e qualitativas de sua estrutura macroscópica geral, mas também diversas modificações microscópicas (OLIVEIRA et al., 2006).

A placenta apresenta morfologia bastante diversificada, apresentando grande diversidade de tamanho, arquitetura e componentes da barreira materno-fetal, sujeito a um padrão de variabilidade nos diferentes mecanismos, que são ativados no seu desenvolvimento, garantindo a formação de um órgão altamente eficiente para a troca respiratória, de nutrientes e também de metabólicos (OLIVEIRA, 2004).

As placentas são classificadas de acordo com diferentes critérios, como a formação dos vasos placentários, anatomia, histologia, nutrição, implantação e a perda de tecidos durante o parto. Quanto à formação dos vasos placentários podem ser coriovitelina, quando são formadas pelos vasos vitelínicos, o qual tem a funcionalidade restrita ao transporte de células sanguíneas, originados na própria vesícula vitelina.

Na grande maioria dos animais esse tipo de placenta não exerce trocas de substâncias com a mãe. Este tipo de placenta sempre precede a formação da placenta propriamente dita, a placenta corioalantoidiana que a substitui formando os vasos sanguíneos placentários definitivos a partir da parede mesodérmica do alantoide ou da vesícula alantoidiana, conforme o caso (GARCIA, 2012).

Anatomicamente elas são classificadas em: difusas, cotiledonárias, zonária e discoidal, já histologicamente em: epiteliocorial, mesocorial, endoteliocorial, hemocorale hemoendotelial

Normalmente as espécies da Ordem Rodentia possuem uma placenta principal zonária discoidal, corioalantóidea e estruturalmente organizada em três regiões distintas: labirinto, zona juncional ou espongiotrofoblasto e decidua (COAN et al., 2004). Essas camadas de tecido são responsáveis por promover os meios necessários para regular a comunicação e transferência de nutrientes, hormônios, íons, gases, excretas e água entre a mãe e o feto em desenvolvimento.

Ultra estruturalmente a placenta corioalantóidea é classificada como hemocorial, pois a interação materno-fetal resulta da invasão do leito vascular uterino pelo trofoblasto, que passa a ser banhado pelo sangue materno extravasado, assim como ocorre em outros animais como chiropteros (RASWEILER, 2000), xenartras (REZENDE et al., 2012), lagomorfos (ENDERS, 2004) e na própria placenta humana (MALASSINÉ et al., 2003).

Na espécie humana inicia entre o 7º e o 12º dia. Ocorre na região supero posterior do endométrio especificamente em um local que a partir do início da implantação passa a ser chamado de decídua basal, pois durante a invasão nessa região uterina as células deciduais são formadas. O embrião, na fase de blastocisto pré-implantado, tem o seu trofoblasto modificado para citotrofoblasto que são células mais ativas. Essas células, por sua vez, formam o sinciciotrofoblasto que tem característica invasiva devido à produção de enzimas que digerem o tecido do endométrio (WOLPERT, 2000)

As células deciduais nutrem o embrião na fase inicial e ativam o sinciciotrofoblasto. Com o desenvolvimento dessa estrutura, formam-se espaços intervilosos separados por trabéculas, onde se estabelecerão as vilosidades placentárias. Essa formação se dá em três etapas: vilosidades primárias, secundárias e terciárias entre o 14º dia e o 3º mês. Elas são constituídas por elementos do cório (trofoblasto, inicialmente e com posterior substituição pelo citotrofoblasto e sinciciotrofoblasto, mesoblasto extraembrionário e vascularização alantoidiana). Desenvolve dentro da mucosa uterina, formando inicialmente uma placenta difusa (MOORE, 2015).

Histologicamente a placenta é formada por uma porção alantoideana e outra coriônica, ambas oriundas do mesoderma e a invasão vascular acompanha o mesoderma alantoideano (ALLEN, 2005).

De um modo geral a placenta de roedores pode ser classificada como discoidal, labiríntica e hemocorial (MOSSAN, 1987). Segundo Carter (2004) a placenta de roedores é classificada como discoidal ou esféricas e com áreas labirínticas nas quais há desenvolvimento da zona esponjosa onde ocorre trocas sanguíneas.

O útero de roedores de laboratório no início da prenhez muda de uma forma irregular para uma luz com criptas na mucosa com orientação antimesometrial/mesometrial antes do blastocisto se fixar ao epitélio luminal (DANTER,1988).

2.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão e Varredura

O microscópio eletrônico de transmissão utiliza um feixe de elétrons sob alta tensão emitido por uma coluna de elétrons. Lentes eletromagnéticas são utilizadas para focalizar o feixe de elétrons na amostra. Ao passar através da amostra, os átomos que constituem o feixe de elétrons produzem diferentes tipos de radiação. Em geral, apenas os elétrons transmitidos são analisados pelo detector, o que se traduz sinal de imagem mista (KESTENBACH,1989)

A parte mais importante desde microscópio é a coluna, onde o feixe de elétrons é gerado e dirigido para atravessar a amostra e onde a imagem será ampliada para a realização da análise e registro digital. Os elementos principais que controlam a passagem dos elétrons pela coluna são: filamento, anodo, sistema de alinhamento, lente condensadora, correção de astigmatismo, campo escuro, lente objetiva, lente projetora e tela (BOTTA FILHO, 1989).

O microscópio eletrônico de transmissão é muito utilizado para análise de materiais biológicos, pois permite a definição de imagens intracelulares, possibilitando observar a morfologia celular, aspectos gerais das organelas, a organização molecular de vírus ou constituintes subcelulares, a interação de parasitas-células, fornecendo informações sobre alterações celulares ocasionados por vírus, fitoplasmas, micoplasmas, bactérias, entre outros organismos diminutos, de impossível visualização na microscopia óptica (GALLETI, 2003).

A preparação de amostras para microscopia eletrônica de transmissão requer muito cuidado. O material precisa ser cortado em uma série de secções

ultrafinas. Para obtenção desses cortes, a amostra precisa ser submetida a vários processos específicos que garantam a preservação de suas propriedades originais durante a análise. Esses passos variam de acordo com a amostra e objetivo de estudo, sendo de forma geral utilizados os métodos de fixação, desidratação, inclusão e ultramicrotomia (GRIMSTONE, 1980).

O Microscópio Eletrônico de Varredura atinge resoluções que na ordem de 3.0 nm e grande profundidade de foco, da ordem de 300 vezes melhor que a do microscópio óptico, resultando em imagens com aparências tridimensionais. Utilizando-se elétrons de baixa energia, da ordem de 50eV, têm-se informações topológicas da amostra. Já com elétrons de alta energia, têm-se informações sobre topologia, número atômico ou orientação (MACHADO, 2007).

As principais aplicações do MEV para as áreas biológicas demandam o estudo de detalhes estruturais finos, de objetos pequenos, tridimensionais. Assim, o microscópio tem sido utilizado em análises de objetos, como grãos de pólen, esporos de fungos, superfícies de folhas, ornamentação superficial de sementes de frutos, cutícula e ovos de insetos, diatomáceas, foraminíferos e pequenos fósseis (GRIMSTONE, 1980).

Como a análise em MEV é realizada com a coluna do instrumento em vácuo, as amostras precisam estar secas. Espécimes relativamente resistentes que contenham em sua forma original baixo teor de água, tais como grãos de pólen, sementes, diatomáceas, carapaças de forminíferos, paredes celulares espessas ou cutícula de insetos, necessitam de pouca preparação. Essas amostras resistem à dissecação sem colapsar. No entanto, para amostras mais delicadas (como protozoários ou células inteiras crescidas em cultivo de tecidos) ou naquelas onde a estrutura interna deve ser examinada, são necessários outros processos, por exemplo, métodos específicos de desidratação, que evitam o dano geralmente causado por agentes desidratantes orgânicos, como o etanol. Logo, o método de preparação da amostra depende da natureza da mesma.

As amostras biológicas que precisam ser preparadas, passam por etapas de coleta, seleção, limpeza (remoção de detritos depositados na

superfície a ser estudada, mas sem afetar suas características originais), estabilização da forma (fixação) e desidratação (SILVEIRA,1998)

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliação morfológica da placenta do *Holochilus scireus* naturalmente infectado pelo *Schistosoma mansoni*

3.2 Específicos

- Caracterizar o tipo de placenta de *H. scireus*;
- Avaliar se há passagem ovos ou parasitos adultos de *S. mansoni* para as diferentes regiões da placenta;
- Caracterizar as principais alterações da placenta das fêmeas infectadas por *S. mansoni*;
- Verificar se os ovos de *S. mansoni* atingem os vasos fetais na placenta

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Local de Estudo

São Bento é um município do estado do Maranhão com população de 40.736 habitantes, com área de unidade territorial de 459,068 km² e densidade demográfica de 88,74 hab/km² (IBGE, 2010). Localizado na mesorregião Norte Maranhense e microrregião Baixada Maranhense, situado a 314 km da capital do estado do Maranhão.

A Baixada Maranhense, local onde o município encontra-se inserido, é formada pelo maior conjunto de bacias lacustres do Nordeste Brasileiro, abrangendo as bacias hidrográficas dos rios Mearim, Pindaré, Grajaú, Aurá, Pericumã, Turiaçu e outros menores. Apresenta clima tropical úmido, destacando-se duas estações climáticas: uma chuvosa, entre janeiro e julho e outra seca entre agosto e dezembro. Nessa região encontra-se um dos mais importantes focos de esquistossomose humana do Estado e a presença do roedor *Holochilus sciureus*, hospedeiro alternativo da esquistossomose.

4.2 Captura de roedores

Foram avaliados no período de setembro de 2019 a março de 2020 um total de 13 fêmeas da espécie *Holochilus* sp, das quais 4 encontravam-se em

diferentes estágios de gestação. Os roedores *Holochilus sciureus* foram capturados utilizando armadilhas do tipo Tomahawk, as quais foram depositadas em alguns pontos do campo alagado, característico da região de São Bento, onde esses animais costumam fazer seus ninhos utilizando vegetação aquática. As armadilhas foram colocadas durante à noite, com uma distância mínima de 10 metros uma da outra, tendo como isca, banana untada com pasta de amendoim. Sendo eutanásia dos animais realizada de acordo com os protocolos do Comitê de Experimentação Animal e do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO pelo número 718991 (anexo I)

4.3 Análises biométricas

Para iniciar as análises biométricas, os roedores foram anestesiados com ketamina 5% e cloridrato de xylasina 2%, sendo utilizados 0,1 e 0,2 mL por 100g de peso, e administrado por via intraperitoneal (PADDLEFORD, 2001). Em seguida, com o auxílio do paquímetro (com precisão de 0,1 mm) e fita métrica foram medidos o comprimento total (CT), comprimento cabeça-corpo, comprimento cauda. Por fim, foi realizada a análise da massa corporal (MC), com o auxílio da balança e a identificação quanto ao sexo dos animais capturados, nas quais somente as fêmeas continuaram no estudo e os machos foram devolvidos ao local de coleta.

4.4 Análise da Positividade para *S. mansoni* nos Roedores

A análise de positividade do parasito nos roedores foi realizada por meio do método Kato-Katz (KATZ, 1972), de forma qualitativa, pela identificação de ovos nas fezes. Neste método foram utilizadas três lâminas para cada amostra de fezes.

Após a eutanásia e por conseguinte a exposição dos órgãos, coletou-se as fezes do animal em todo terço do intestino, com o objetivo de identificação de ovos do *S. mansoni*. Para o diagnóstico, utilizou-se o método padrão ouro segundo Chaia (1968) de Kato-Katz, o método simplificado de Kato (1954), foi realizado da seguinte forma: colocou-se uma pequena amostra de fezes sobre papel absorvente, em seguida depositou-se em uma tela de nylon a qual foi

comprimida com auxílio da espátula para retirar o excesso de fezes com a lateral da espátula. A lâmina foi invertida sobre uma superfície lisa e pressionada de modo a espalhar uniformemente o material entre lâmina e lamínula evitando o extravasamento das fezes. Aguardou -se 30 min. para clarificação do esfregaço fecal; o material foi examinado ao microscópio de luz. Os ovos do *S.mansoni* apresentam três camadas: camada externa microespinhosa, camada densa intermediária medial e camada densa interna. A camada chamada de Reynold (Reynold`s layer), se desenvolve subjacentemente à casca do ovo, que possui ramificações filamentosas compactas e uma camada única de células escamosas (LINS, 2008)

4.5.Análise Histológica e Ultraestrutural

Além de placentas foram coletados fragmentos de fígado, útero, intestino e rim, sendo o material fixado em solução de paraformoldeído tamponado a 4%. Após a fixação o material processado para a inclusão em parafina, segundo técnica descrita por Luna (1968). Secções de 5 µm foram corados por Hematoxilina e Eosina, Tricrômio de Masson e Ácido Periódico de Shiff (PAS).

Para a técnica de microscopia eletrônica de varredura, amostras das placentas foram fixadas em paraformoldeído a 4%. Após fixação foram lavadas em tampão fosfato a 0,1 M pH 7,4, e pós fixadas em tetróxido de ósmio a 1%, seguido de desidratações contínuas em álcool etílico (70%, 80%, 90%, 95% e 100%). Por fim as mesmas foram desidratadas à seco em ponto crítico (Balzers CPD 020). Posteriormente o material foi colocado em um suporte metálico para revestimento em ouro (“sputtering” Emitech K550). Para observar os resultados foi utilizado o microscópio eletrônico ME Leo 435

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram avaliados no período de setembro de 2019 a março de 2020 um total de 20 ratos da espécie *H. sciureus*. Destes, 13 eram fêmeas, as quais

foram incluídas no estudo. Os animais foram eutanasiados de acordo com os protocolos do Comitê de Experimentação Animal e do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO pelo número 718991 (anexo I).

A Tabela 1 mostra os dados biométricos das fêmeas de *H. Sciureus*

Tabela 1: Avaliações biométricas das fêmeas de *Holochilus sciureus* capturadas no município de São Bento – Maranhão.

DADOS BIOMÉTRICOS

	Cca*	Cco*	Cc*	CT*	PESO**	GESTAÇÃO	MÉDIA*
FEM 1	9,5	11,5	10,1	31,1	218,80	10 dias	10,36
FEM 2	8,3	9,1	11,2	28,6	128,25	7 dias	9,5
FEM 3	7,5	9,4	9,6	26,5	112,77	8 dias	8,83
FEM 4	5,6	8,3	9,0	22,9	97,12	-	7,63
FEM 5	9	10,1	12,0	31,1	220,05	10 dias	10,36
FEM 6	8	9,9	11,1	29	130,22	14 dias	9,66
FEM 7	8,7	10,5	10,3	29,5	164,85	18 dias	9,83
FEM 8	9,0	12,0	10,3	31,3	223,18	15 dias	10,43
FEM 9	6,9	10,9	10,9	28,7	120,36	13 dias	9,56
FEM 10	7,9	9	12,0	28,9	128,60	14 dias	9,63
FEM 11	8,9	13,1	9,9	31,9	227,1	20 dias	10,6
FEM 12	6,7	9,2	8,5	24,4	99,75	6 dias	8,1
FEM 13	5,3	8,9	12	26,2	103,49		8,7

Cca = Comprimento da cabeça

Cco = Comprimento do corpo

Cc = Comprimento da calda

CT = Comprimento total

* Dados de comprimento avaliados em centímetro com o auxílio do paquímetro

** Peso em gramas, medidos com a balança de precisão analítica.

- Não gestante

Os dados biométricos mostram que as fêmeas (1,5,8,11) eram de maiores e mais pesadas devido a estarem em um processo avançado de gestação

A análise macroscópica da cavidade abdominopélvica revelou que 8 fêmeas capturadas apresentavam útero contendo fetos bem desenvolvidos e uma das fêmeas apresentou uma estava em fase inicial da gestação (Foto 1).

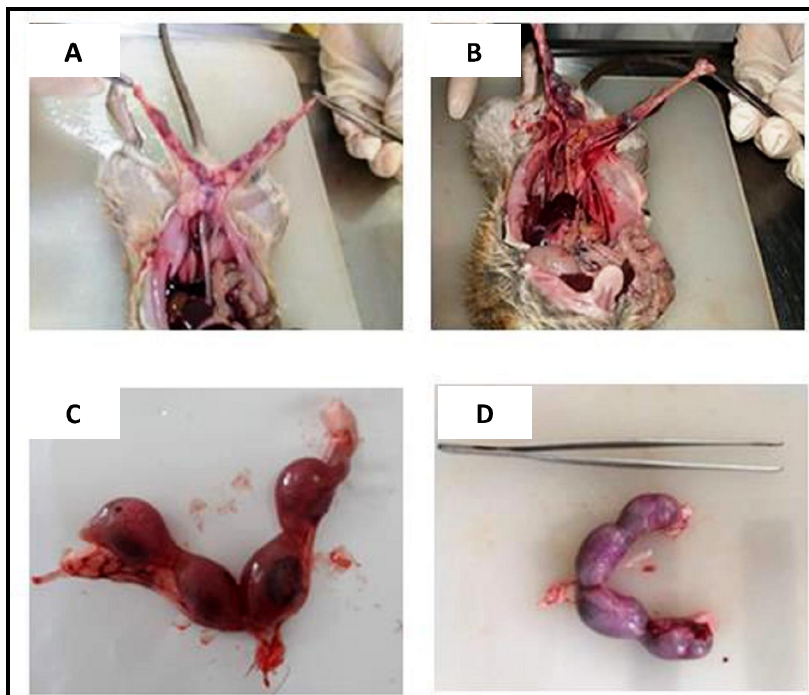


Foto 1: Placentas gravídicas em diferentes fases gestacionais (gestações durando de 21 á 25 dias) figura A e B entre os primeiros 7 a 10 dias, figura C entre os 12 a 15 dias, figura D em fase final de 16 a 20 dias

O exame macroscópico mostrou também que o útero de *Holochilus* tem dois cornos que se abrem em um canal cervical comum. Histologicamente, o útero é semelhante a outras espécies de roedores.

Nas fezes de 6 animais foram identificados ovos de *S. mansoni* (Foto 2). Para Enk et al. (2008), a presença de ovos em fezes é um indicador de infecção.



Foto 2: Ovo de *S. mansoni* identificado em fezes de *Holochilus sciureus* pelo método Kato-katz.

A identificação de ovos viáveis nas fezes de *Holochilus*, confirmam a importância desse roedor na manutenção e disseminação da esquistossomose na região da Baixada Maranhense (SILVA-SOUZA et al., 2019).

Embora as fêmeas prenhes estivessem intensamente parasitadas não foi identificado ovo ou vermes adultos no tecido placentário ou tecido fetal por meio das técnicas utilizadas. Esses achados mostraram que a transmissão vertical não ocorreu nos animais estudados, provavelmente em humanos, também não ocorre esse tipo de transmissão, considerando que a placenta se constitui em barreira que impede a passagem da maioria dos microrganismos que afetam a gestante, conforme descrevem Jing et al. (2021).

Os roedores em geral apresentam muitas características semelhantes à placenta humana (disco hemocorial), citadas por Egund & Carter (1974), por

isso são utilizados em estudos da função placentária, cujos resultados podem ser em parte extrapolados para humanos (MESS 2007)

Na análise histológica observou-se que a placenta no estágio inicial apresentava a região de labirinto formando a maior porção do disco placentário, o qual é constituído por colunas de células trofoblásticas, que delimitam lacunas preenchidas por sangue materno extravasado (Foto 3: A- C).

Foram identificadas células trofoblásticas de natureza sincicial denominadas de sinciciotrofoblastos (Foto 3: E). Os capilares fetais na região de labirinto apresentam células endoteliais de formato alongado. Entre os capilares fetais e as lacunas maternas estavam presentes muitas células trofoblásticas, identificadas pelo seu tamanho maior com núcleos ovoides e com cromatina em grânulos (Foto 3: E). A zona de espongiotrofoblasto era formada por células trofoblásticas. No início da gestação esta região estava disposta de forma irregular (Foto 3: D), enquanto no final da gestação a região de espongiotrofoblasto estavam mais agrupadas e formando uma faixa contínua (Foto 3 A).

A placenta em final de gestação, na transição entre a zona de espongiotrofoblastos e a decídua, apresentava muitas células trofoblásticas gigantes. Estas células apresentavam um citoplasma acidófilo e núcleos grandes (Foto 4 : B-C).

A decídua é uma região de origem de tecido materno, resultante do crescimento e proliferação do estroma da camada do endométrio uterino. As células dessa região são pequenas com citoplasma acidófilo e núcleos ovoides. Os núcleos são localizados na região central do citoplasma da célula (Foto 3F).

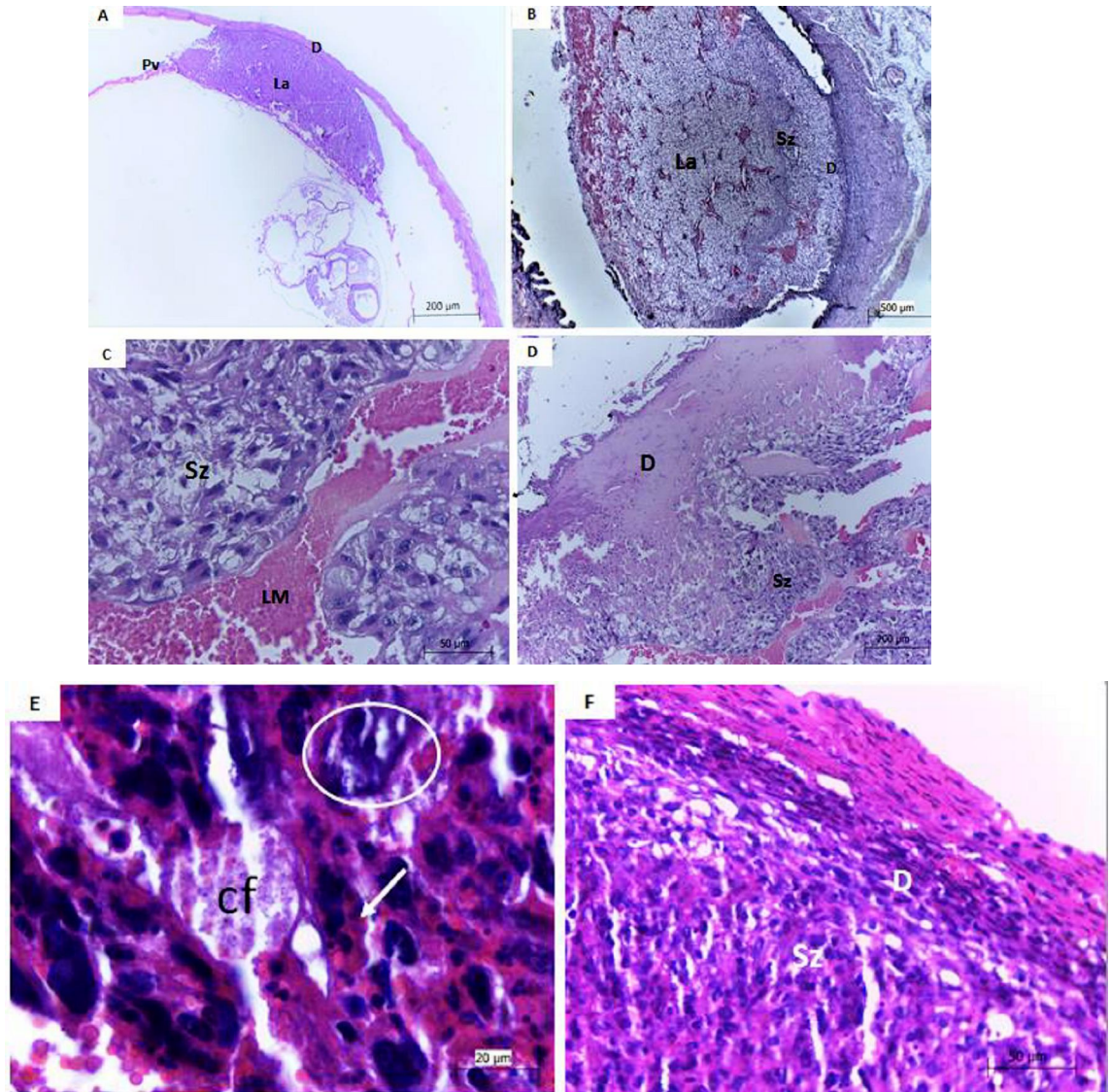


Foto 3: Histologia da placenta. **A e B:** Visão geral da placenta, observar a sintopia da placenta vitelínica e a formação da região do labirinto placentário. **C:** Região da zona de espongiotrofoblastos, notar sangue materno extravasado nas lacunas maternas. **D-** Observar a região da decídua continua a zona de espongiotrofoblastos. **E-** Observar a região do sincício inicial, os núcleos ficam próximos uns dos outros, em círculo observar célula trofoblástica gigante, em cf (capilares fetais) .

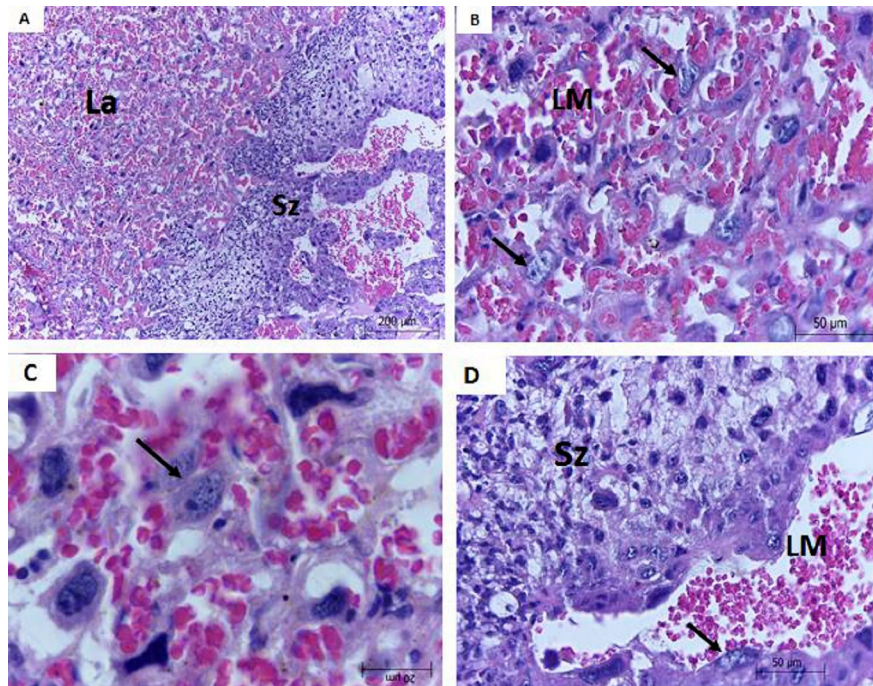


Foto 4 :A- Placenta de *Holochilus sciureus* no final da gestação. Observar a sintopia do labirinto placentário com a zona de espongiotrofoblastos com a qual mantém um contato íntimo. **B-** Região do Labirinto placentário, notar a grande quantidade de sangue materno extravasado nas lacunas maternas (**LM**). Notou-se que as lacunas maternas na região do labirinto não apresentam endotélio de revestimento, com exceção aos capilares fetais presentes no labirinto, sendo possível observar uma grande quantidade de células trofoblásticas (**setas**). **La** - Labirinto placentário, **Sz** - Zona de espongiotrofoblastos

A análise ultra estrutural mostrou que a placenta do roedor *H. sciureus* é do tipo vitelínica e é formada por células endodérmicas, que se dispõem em forma de dobras. Estes achados são semelhantes aos descritos por Gaynor et al.;(1961) que afirmam que a placenta de alguns roedores é semelhante entre si, as quais possuem ramificações voltadas para a placenta principal (corioalantoidea).

Na análise ultra estrutural foi observado no presente trabalho que uma fina camada mesotelial delimitava e sustentava as células endodérmicas de formato hexagonal segundo a Foto 5 (A e B). Nas regiões onde o saco vitelino visceral encontrava-se distante da placenta corioalantóide (próximo a parede uterina), o mesmo apresentava-se compacto e ausente de ramificações mostradas na Foto 5 (C e D).

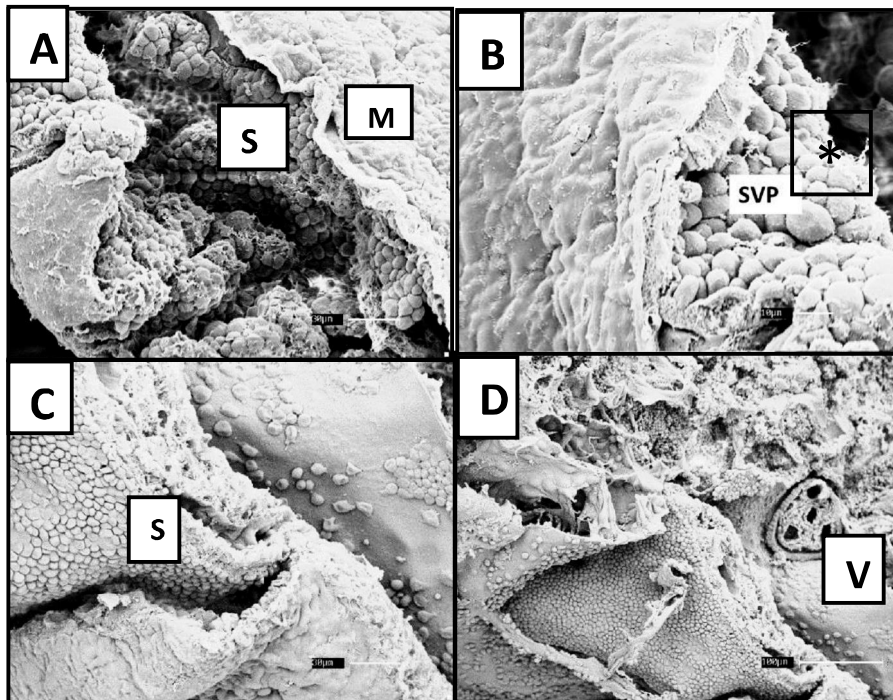


Foto 5: Microscopia Eletrônica de varredura da placenta de *Holochilus brasiliense*. **SVP**- células que compõem o saco vitelino parietal revestindo a face fetal da placenta ; **VS**- vasos sanguíneos; **M**- camada mesotelial ; * Células endodérmicas de formato cuboide.

A Foto 6 mostra uma visão panorâmica da placenta corioalantóide em estágio final de gestação, onde se observa o labirinto, que corresponde a maior porção do disco placentário.

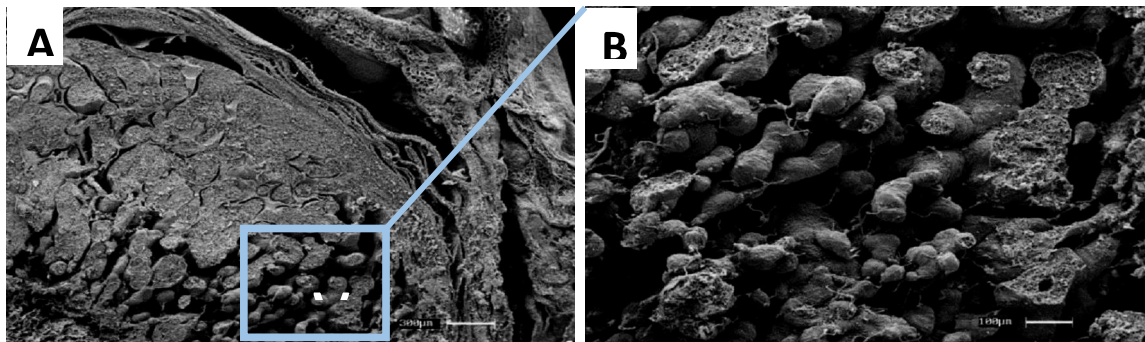


Foto 6: Microscopia Eletrônica de Transmissão da placenta de *Holochilus brasiliense*. Visão panorâmica do disco placentário (A, com o quadrado azul evidenciando)

A placenta é um órgão multifuncional responsável pelo fornecimento de nutrientes e transferência de produtos residuais da circulação fetal à circulação materna (JOSHI ET AL. 2016). Além disso funciona com uma barreira que protege o feto contra substâncias tóxicas e ação de patógenos. A barreira placentária é composta pelo sincitiotrofoblasto, que está em contato com o sangue materno, o citotrofoblasto ou células trofoblásticas internas), o mesoderma e o sistema vascular fetal (DIAZ_LUJAN ET AL., 2016).

Comparando-se a placenta humana com os roedores em especial, a de *H. sciureus* observa-se que são bastante semelhantes quanto a relação materno fetal, por isso, os resultados do estudo da transmissão vertical nesse roedor pode sinalizar o que ocorre em humanos.

O roedor *Holochilus* é encontrado naturalmente infectado por *S. mansoni* na Baixada Maranhense, local onde poucas pessoas contam com serviço de água encanada e esgoto e, grande parte das pessoas, incluindo as mulheres, realizam atividades de lazer, pesca e até mesmo lavagem de roupas nas águas onde circulam esse roedor, o caramujo e o parasito, o que favorece o contágio. Em nosso estudo considerando a similaridade das placentas,

averiguamos se havia transmissão vertical ou lesões na placenta que pudesse interferir no desenvolvimento fetal.

Em todas as placentas examinadas não foram observadas lesões, provavelmente, um dos fatores que explica é a eficiência da barreira transplacentária como também o tamanho do ovo, o qual é no tamanho de 110µm possuindo um conteúdo altamente granulado dificultando assim a passagem pela barreira transplacentária, além disso, o parasita tem dimensões que não permitiram a passagem.

Do ponto de vista histológico a placenta humana apresenta compartimentos, que funcionam como uma unidade vascular dentro da placenta. Essas estruturas contêm uma vilosidade formada no lado fetal da placenta a termo, que formam uma árvore, a qual contém um capilar fetal central, estroma de vilosidade e uma camada trofoblástica externa, que é banhada em sangue materno.

Essa camada externa é composta por uma membrana sincitiotrofoblástica multinucleada formada pela fusão de células-tronco citotrofoblásticas mononucleares (SYME et al. 2004). Características semelhantes foram descritas em *H. sciureus*.

6 CONCLUSÕES

A placenta de *H. sciureus* apresenta características semelhantes à placenta dos roedores já descritas na literatura

Não foi evidenciado a transmissão vertical neste trabalho e nem lesões na placenta dos roedores.

As fêmeas prenhes capturadas apontaram que esse animal tem um alto potencial reprodutivo, possuem placenta discoidal do tipo corioalantoide em estágio final da gestação.

ANEXOS

ANEXO I: Parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal - CEEA

DATA DA ENTREGA DO PROCESSO	NÚMERO DO PROCESSO	NÚMERO DO PARECER	DATA DO PARECER
10/03/2019	38/2019	38/2019	03/10/2019

FORMULÁRIO DE PARECER

1. TÍTULO DO PROJETO
 AVALIAR A TRANSMISSÃO VERTICAL DO PARASITO *S. mansoni* ATRAVÉS DE TÉCNICAS HISTOLÓGICAS E DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO E VARREDURA.

2. LOCAL DA EXECUÇÃO (IES/Laboratório)
 Laboratório de Anatomopatologia/Medicina Veterinária /UEMA/CCA

3. OBJETIVO
Geral: Verificar a transmissão vertical do parasito *S. mansoni* através de técnicas histológicas e de microscopia eletrônica de transmissão e varredura.
Específicos: Caracterizar a barreira-placentária dessas espécies de roedores; Verificar a localização dos ovos de *S. mansoni* nas diferentes regiões da placenta através das técnicas de microscopia de luz, eletrônica de varredura e transmissão; Quantificar a incidência da transmissão pela quantificação do número de ovos de *S. mansoni* na placenta; Caracterizar as alterações causadas na placenta das fêmeas infectadas por *S. mansoni*; Verificar se os ovos de *S. mansoni* atingem os vasos fetais na placenta.

4. ESPÉCIE ANIMAL/RAÇA
 Espécie Animal: rato

5. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA AUTORIZADA.
 Número de animais/grupo: 20 Número de grupo: 1 Quantidade total de animais: 20

6. PERÍODO DE EXECUÇÃO DA PESQUISA
 Início: 01/11/2019 Término: 28/03/2020

7. PESQUISADOR RESPONSÁVEL/EXECUTOR
 Executor da pesquisa: Gabriel Gomes Leoncio
 Nome do orientador: Prof.ª Dr.ª. Ana Lúcia Abreu Silva

8. EQUIPE/COLABORADORES
 Néuton Silva Souza. (Universidade Estadual do Maranhão)
 Ana Lúcia Abreu Silva (Universidade Estadual do Maranhão)

9. PARECER
 Projeto aprovado na reunião do CEEA do dia 03/10/2019 por atender as normas de Bem-Estar Animal da resolução do CFMV nº 1000/2012 e a Lei 11.794/2008.

Alsona 05/03/2022



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DO
MARANHÃO

Centro de Ciências Agrárias
Curso de Medicina Veterinária
Comissão de Ética e Experimentação Animal (CEEA)
Credenciamento Provisório - CONCEA/MCT
Processo 01200.002200/2015-06(449) - Emissão 19/06/2015

DECLARAÇÃO

Declaramos para devidos fins que o projeto intitulado "Avaliar a transmissão vertical do parasito *S. mansoni* através de técnicas histológicas e de microscopia eletrônica de transmissão e varredura" foi aprovado pela Comissão de Ética e Experimentação Animal - CEEA do Curso de Medicina Veterinária da UEMA, conforme protocolo nº 38/2019 aprovado em 03/10/2019, para o período de execução da pesquisa entre os meses de novembro/2019 a março/2020, pela equipe coordenada pelo Prof.ª Dr.ª Ana Lúcia Abreu Silva, o membro executor Gabriel Gomes Leoncio e o colaborador Nêuton Silva Souza por atender as normas de Bem-Estar Animal da Resolução do CFMV nº 1000/2012 e a Lei 11.794/2008.

São Luís, 05 de fevereiro de 2020.

Prof.ª Dra. Alana Lislea de Sousa
Presidente do CEEA/CMV/UEMA

ANEXO II: Licença SISBIO



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 71899-1	Data da Emissão: 23/09/2019 12:22:54	Data da Revalidação*: 23/09/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Gabriel Gomes Leôncio	CPF: 036.288.563-02
Título do Projeto: CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DA TRANSMISSÃO CONGÊNITA DE ESQUISTOSSOMOSE VIA BARREIRA-PLACENTÁRIA EM ROEDORES SILVESTRES DA BAIXADA MARANHENSE.	
TRABALHO EM PARCERIA COM AS UNIVERSIDADE FEDERAL (UFMA) E ESTADUAL DO MARANHÃO (UEMA) E FIOCRUZ	
Nome da Instituição: Fundação Universidade Federal do Maranhão	CNPJ: 06.279.103/0001-19

ANEXO III: Manuscrito Submetido (revista: placenta; ISSN: 0143-4004; qualis de valiação: B1 em Medicina I, fator de impacto: 3,1)

Placenta

Morphological analysis of placenta of the *Holochilus sciureus* a natural host of the *Schistosoma mansoni*

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Original article
Keywords:	Schistosoma mansoni, placenta, rodents, natural host
Corresponding Author:	Ana Lucia Abreu-Silva Universidade Estadual do Maranhão Sao Luis, MA BRAZIL
First Author:	Ana Lucia Abreu-Silva
Order of Authors:	Ana Lucia Abreu-Silva Gabriel Gomes Leônico Hianka Jasmine Costa de Carvalho Thais Rafisa Matos Adriana Raquel de Almeida da Anunciação Fabio Henrique Evangelista Andrade, Dr Wendel Wendel Fragoso de Freitas Moreira
Abstract:	<p>Introduction: Schistosomiasis is endemic in the Baixada Maranhense/ Maranhão State, where the rodent <i>Holochilus sciureus</i> is natural host for <i>Schistosoma mansoni</i>. Considering the importance of that host in the cycle of <i>S. mansoni</i>, this paper aimed to study the placenta of this rodent morphologically and evaluate if the parasite or egg are able to across placental barrier. Methods: A total of thirteen females of <i>Holochilus sciureus</i> were captured in the São Bento, a municipality that composes the Baixada Maranhense/Brazil. During the necropsy, the animals infected by <i>S. mansoni</i> were evaluated to identify whether they were pregnant and stool samples were obtained for parasitological examination. For parasitological analysis Kato-Katz method was performed. Fragments of placenta, lung, small intestine, liver and uterus were analyzed by scanning electron microscopy and histopathology.</p> <p>Results: The vitelline placenta of <i>Holochilus sciureus</i> is composed of endodermal cells arranged in the shape of a fold that were turned towards the main placenta (chorioallantoic). A thin mesothelial layer delimited and supported hexagonal shaped endodermal cells. The regions where the visceral yolk sac was far from the chorioallantoic placenta were compact and no branches were observed. Although granulomas have been observed in the liver, esophagus and small intestine and mild fibrosis in the lungs, no lesions were seen in fetuses or placenta, indicating that <i>Schistosoma</i> does not across placental barrier of this rodent.</p> <p>Discussion: The similarity of morphological structures between rodents and the human placenta shows that, <i>Holochilus sciureus</i> may be an excellent models for future preclinical research</p>
Suggested Reviewers:	Lara Morley laracmorley@gmail.com NAB Simpson simpson@leeds.ac.uk

REFERÊNCIAS

ALVIM, M. de C. A esquistossomose no Maranhão. Belém: **Hiléia Médica.**, 1980.

ALLEN, M.L. Das Siidamerikanische wasserschwein (Hydrochoerushydrochaeris, L. 1766) Physiologisch-anatomische und klinische untersuchungen unter dem aspect der versuchstierkundlichen eignung. Aachen. Giessen. 1993. 133 f. Tese (Doutorado) – Fachbereich Veterinärmedizin, Justus – Liebig – Universität Giessen, Giessen, 2005

AMORIM JP. Roedores selvagens como disseminadores de ovos de *Schistosoma mansoni*. **Revista de Medicina Tropical**, São Paulo, v.4, p.397-402, 1962.

AMARAL RS, TAUIL PL, LIMA DD, ENGELS D. An analysis of the impact of the Schistosomiasis Control Programme in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 2006;101(Supl. I):79-85

ARANTES, M.E. Reposicionamento in silico de novos fármacos contra o *Schistosoma mansoni*. Dissertação de mestrado - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, p.1-88, 2016.

BASTOS OC, SCHIAVOTELO RJG, RIBEIRO MLJF. Suscetibilidade de *Biomphalaria tenagophila* à infecção por linhagens de *Schistosoma mansoni* da Baixada Maranhense (Maranhão, Brasil). **Revista Saúde Pública**. 1984 out;18(5):355-8.

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

BEHMER, O. A; TOLOSA, E. M. C. de; FREITAS NETO, A. G. de. Manual de Técnicas para Histologia normal e patológica. São Paulo: EDART, Ed. da Universidade de São Paulo, 1976. pp. 27-32

BONVICINO CR, OLIVEIRA JA, D'ANDREA PS. Guia dos roedores do Brasil, com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos. Rio de Janeiro: Centro Pan-Americano de Febre Aftosa – OPAS/OMS; 2008. 120 p. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ioc/media/livro%20roedores.pdf>. Acesso em novembro de 2020

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Vigilância em saúde: dengue, esquistossomose, hanseníase, malária, tracoma e tuberculose. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Cadernos de Atenção Básica, nº 21. Brasília: Ministério da Saúde; 2007

CAMERON, T.W.M. (1928): A new definitive host for *Schistosoma mansoni*. **Journal of Helminthology.**, 5: 219 – 222

CANTANHEDE SPD, FERNANDEZ MA, MATTOS AC, MONTRESOR LC, SILVA-SOUZA N, THIENGO SC. Freshwater gastropods of the Baixada Maranhense Microregion, an endemic area for schistosomiasis in the State of Maranhao, Brazil: I - qualitative study. **Revista da Sociedade Brasileira Medicina Tropical**. Citado em novembro 2020. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v47n1/0037-8682-rsbmt-47-01-79.pdf>

COURA JR, AMARAL RS. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in brazilian endemic areas. **Memorias Instituto Oswaldo Cruz** 2004; 99(Suppl 1): 13-9

COUTO JLA. Estudo e identificação de espécies de Biomphalaria transmissoras da esquistossomose em três municípios do Estado de Alagoas. In: Resumos do XV Congresso Brasileiro de Parasitologia, Salvador, p. 42, 2005

COAN, A. M.; ENDERS, A. C. Comparative Aspects of trophoblast development and placentation. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v.2, p.46, 2004

CUTRIM, R. M. N; CHIEFFI, P. P; MORAES, J. C. Schistosomiasis mansoni in the "Baixada Ocidental Maranhense", state of Maranhão, Brazil: Cross-sectional studies performed in 1987 and 1993. **Revista do Instituto de Medicina Tropical** de São Paulo, vol. 40(3) São Paulo, 1998.

CUNHA LDA, GUEDES SAG. Prevalência de esquistossomose mansônica na cidade de Nossa Senhora do Socorro. *Ideias & Inovação*. 2012 out;1(1):41-8

CHOI, M.; YU, J. Who Neglects Neglected Tropical Diseases ? – Korean Perspective. *Neglected tropical diseases*, v. 30, p. 122–130, 2015. CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S.. *Parasitologia Humana e Seus Fundamentos Gerais*. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 390 p

DÍAZ-LUJÁN C., TRIQUELL M. F., CASTILLO C., HARDISSON D., KEMMERLING U., FRETES R. E. (2016). Role of placental barrier integrity in infection by *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropical Journal**. 164, 360–368. 10.1016/j.actatropica.2016.09.021, PMID

DRUG TRANSFER AND METABOLISM BY THE HUMAN PLACENTA SYME, MICHAEL R. ; PAXTON, JAMES W. ; KEELAN, JEFFREY A. **Clinical Pharmacokinetics**, 2004, Vol.43(8), p.487(28)

E. M. LAGO, R. P. XAVIER, T. R. TEIXEIRA, L. M. SILVA, A. A. DASILVA FILHO, AND J. de Moraes, "Antischistosomal agents: of art and perspectives," **Future Medicinal Chemistry**, vol. 10, no. 1, pp. 89–120, 2018.

ENK MJ, LIMA AC, DRUMMOND SC, SCHALL VT, COELHO PM. The effect of the number of stool samples on the observed prevalence and the infection intensity with *Schistosoma mansoni* among a population in an area of low transmission. **Acta Tropical Journal** 2008; 108 (2-3): 222-8

FREITAS, J. et al. Esquistossomose, uma Doença no Contexto da Saúde Pública Brasileira. NOV@: **Revista Científica**, Minas Gerais, v.2, n. 2, 2013. ISSN: 2318-0390

GARCIA, S. M. L., CASEMIRO, G. F. Embriologia. 3. ed. Porto Alegre: 2012. 668p

GALLETI.; SANTOS, T. C.; MIGLINO, M. A. The subplacenta of red-rumped agouti (*Dasyprocta leporina* L.). *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2006. Disponível

em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?tool=pubmed&pubmedid=16740154>>

GARTNER, L.P. et al. Tratado de histologia em cores. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007

GAYNOR **The definitive architecture of the placenta of nutria, *Myocastor coypus* (Molina) 1961. American Association for Anatomy.**

GENTILE R, NETO SFN, D'ANDREA PS. Uma revisão sobre a participação do rato d'água *Nectomys squamipes* na dinâmica de transmissão da esquistossomose mansônica: um estudo multidisciplinar de longo prazo em uma

área endêmica. **Revista Ecologia Australis**. 2010 n14 p711-725.

GBD Collaborators, "Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016," *Lancet*, vol. 390, no. 10100, pp. 1211–1259, 2017

GRIMSTONE, ALBERT VICTOR. O Microscópio Eletrônico em Biologia. Editora Pedagógica e Universidade Ltda; Editora da Universidade de São Paulo: São Paulo, 1980.

GRYSEELS B. Schistosomiasis. **Infectious Disease Clinical**. north. am. 2012; 26: 383–397

HAMS E, AVIELLO G, FALLON PG. The Schistosoma granuloma: friend or foe **Frontiers Immunology**. 2013 Apr;4:89

HOPE M, MCMANUS DP. Molecular variation in the human schistosomes. **Acta Tropica Journal**, v. 53, p. 255-276, 1993

IBGE- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo demográfico 2010**. 2010. Disponível em: <<http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codmun=211050&search=maranhao|sao-bento>>. Acesso em 3 setembro. 2018

___ **Censo demográfico 2009** - 2011. Disponível em: <<http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codmun=211050&search=maranhao|sao-bento>>. Acesso em 30 agosto. 2019

KATZ, N. et al. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, **14**:397-400, 1972

KESTENBACH, HANS-JÜRGEN.; BOTTA FILHO, Walter José. Microscopia Eletrônica: Transmissão e Varredura. São Paulo: **Associação Brasileira de Metais**, 1989.

JOSHI R. F.; MIGLINO, M. A.; FERRAZ, R. H. S.; MORAIS-PINTO, L. Placentação de cutias (*Dasprocta aguti*, CARLETON, M. D.): aspectos morfológicos. **Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science**, v. 40, n. 2, p. 133-137, 2016

LINS RAB, CAVALCANTI CBL, ARAÚJO-FILHO JLS, MELO-JÚNIOR MR, CHAVES MEC. Distribution of eosinophils at different stages of hepatic granuloma evolution in mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 2008 Mar-Apr; 41(2):173-178.

LOWE, J. S.; ANDERSON, P. G. Stevens & Lowe's Human Histology. 4.ed. Philadelphia: Elsevier, Mosby, 2015. p. 7

MACHADO, RAUL D; SOUZA, Wanderley. Desidratação, Inclusão, Ultramicrotomia e Contrastação. In: SOUZA, Wanderlei de (Editor). Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas. Rio de Janeiro: **Sociedade Brasileira de Microscopia**, 2007, pp.22-28.

MELO AGS, MELO CM, OLIVEIRA CCC, OLIVEIRA DS, SANTOS VB, JERALDO VLS. Esquistossomose em área de transição rural-urbana: reflexões epidemiológicas. **Ciências e Cuidados em Saúde**. 2011 jul-set;10(3):506-13.

MESS, H. W.; HISAW, F. L. The fetal membranes of the pocket gopher, illustrating an intermediate type of rodent membrane formation. *American Journal of Anatomy*. v. 64, n. 1, p. 59-109, 2007

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). Departamento de Informática do SUS. Programa de Controle da Esquistossomose [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2014 [citado 2014 mai 4]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinan/pce/cnv/pce.def>

___ Departamento de Informática do SUS. Programa de Controle da Esquistossomose 2010 [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinan/pce/cnv/pce.def>

___ Departamento de Informática do SUS. Programa de Controle da Esquistossomose 2017 [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinan/pce/cnv/pce.def>

MIRANDA GS, RODRIGUES JGM, LIRA MGS, NOGUEIRA RA, GOMES GCC, SILVA-SOUZA N. Monitoramento de positividade para *Schistosoma mansoni* em roedores *Holochilus* sp. Naturalmente infectados. **Ciência Animal Brasileira**. 2015 Jul [citado 2015 ago 02]; 16(3):456-463.

MOORE, D. V. ET AL. A comparison of common laboratory animals as experimental hosts for *Schistosoma mansoni*. **Journal of Parasitology**, **35**:156-70, 1949.

____ K, L., PERSAUD, T.V.N. Embriologia clínica. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 536p.

MORAES, J. Efeito in vitro de extratos e compostos naturais em *Schistosoma mansoni*. Tese de doutorado. Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia/UPS – Instituto Butantan, São Paulo, p. 1-268, 2011

MOSSMAN, H. W.; HISAW, F. L. The fetal membranes of the pocket gopher, illustrating an intermediate type of rodent membrane formation. *American Journal of Anatomy*. v. 64, n. 1, p. 59-109, 1939

NEVES, D. P. *Parasitologia Humana*. 11ª ed. São Paulo: Atheneu, 2011

OLIVEIRA MF, MESS A, AMBRÓSIO CE, DANTAS CAG, FAVARON PO, MIGLINO MA: Chorioallantoic placentation in *Galea spixii* (Rodentia, Caviomorpha, Caviidae). **Reprod Biology Endocrinology** 2016,6:39

OVALLE, W. K.; NAHIRNEY, P. C. *Netter Bases da Histologia*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. p. 4

OZANAN CCAF. Notas sobre o rato de cana, "*Holochilus sciureus*" Wagner, na região do Cariri, Ceará. **Revista Brasileira de Biologia**. 1969

PADYKULA, H. A. Histoquímica e citoquímica. In: WEISS, L.; GREEP, R. O. *Histologia*. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1981. pp. 78-79

RESENDES APC, ET AL. Internação hospitalar e mortalidade por Esquistossomose Mansônica no Estado de Pernambuco, Brasil, 1992/2000. **Cadernos de Saúde Pública** 2005;21(5):1392-1401

Placental ABC Transporters: Biological Impact and Pharmaceutical Significance Joshi, Anand ; Vaidya, Soniya ; St-Pierre, Marie ; Mikheev, Andrei ; Desino, Kelly ; Nyandege, Abner ; Audus, Kenneth ; Unadkat, Jashvant ; Gerk, Phillip **Pharmaceutical Research**, 2016, Vol.33(12), pp.2847-28783

RESENDE, R. F.; MIGLINO, M. A.; FERRAZ, R. H. S.; MORAIS-PINTO, L. Placentação de cutias (*Dasyprocta aguti*, CARLETON, M. D.): aspectos morfológicos. **Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science**, v. 40, n. 2, p. 133-137, 2005

RIBEIRO DE JESUS, A., A. SILVA, L. B. SANTANA, A. MAGALHAES, A. A. DE JESUS, R. P. DE ALMEIDA, M. A. REGO, M. N. BURATTINI, E. J. PEARCE, AND E. M. CARVALHO. 2002. Clinical and immunologic evaluation of 31 patients with acute schistosomiasis mansoni. **Journal Infectious Disease**. 185:98–105

ROLE OF PLACENTAL BARRIER INTEGRITY IN INFECTION BY TRYPANOSOMA CRUZI DIAZ-LUJAN, C. ; TRIQUELL, M.F. ; CASTILLO, C. ;

HARDISSON, D. ; KEMMERLING, U. ; FRETES, R.E. **Acta Tropical**, 2016, Vol.164, p.360(9)

SAUTHIER WOU, ABBA AM, SAUTHIER DEU. Nests of *Oligoryzomys* sp. an *Holochilus brasiliensis* (Rodentia, Cricetidae) e astern Entre Rios Province, Argentina. **Journal Neotropic Biology**. 2010

SAMPAIO, L.N.N.; FRANÇA, J.K.R; LIMA, J.M.S.F.; MIRANDA, L.N. O enfrentamento do paciente e a esquistossomose. **Cadernos de graduação, Ciências Biológicas e da Saúde**. Alagoas, v. 4, n. 2, p. 337-348, 2017

SILVA, C. L.; PERDOMO, F. Algunos aspectos anatómicos e histológicos del genitalfeminino del chiguire (*Hydrochoerus hydrochaeris*).Revista de la Facultad deCiências Veterinárias, v. 30, n. 1-8, p. 89-97, 2019

SOUZA, M. A. A. DE; BARBOSA, V. S.; WANDERLEI, T. N. G.; BARBOSA, C. S. Criadouros de *Biomphalaria*, temporários e permanentes, em Jaboatão dos Guararapes, PE. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, vol.41(3): 252-256, 2019

STIREWALT, M. A. ET Al. The relative susceptibilities of the commonly used laboratory mammals to infection by *Schistosoma mansoni*. **American Journal of tropical. Medicine.**, 31:57-82, 1951

SYMER **Aspectos epidemiológicos e distribuição geográfica da esquistossomose e geo-helintos, no Estado de Sergipe, de acordo com os dados do Programa de Controle da Esquistossomose. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.**,Uberaba, v.44, n.1, p. 91-96, 2004. ISSN 0037-8682.

TABOGA, S. R.; VILAMAIOR, P. S. L. Métodos de estudo da célula. In:CARVALHO, H. F.; RECCO-PIMENTEL, S. M. A Célula.3.ed. Barueri: Manole, 2013. pp. 55-57

VASCONCELOS, C. H.; CARDOSO, P. C. M.; QUIRINO, W. C.; MASSARA, C L.; AMARAL, G. L.; CORDEIRO, R.; CARVALHO, O. DOS S. Avaliação de medidas de controle da esquistossomose mansoni no município de Sabará, Minas Gerais, Brasil, 1980-2007. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, vol.25(5): 997-1006, 2009.

VAN , L.; CALUWARTS, C.; LUYTEN,C.; PIJENENBORG, R. Interstitialtrophoblast invasion in the deciduas and mesomerial triangle during the last third ofpregnancy in the rat.Placenta, v. 27, p. 22 -23, 2003

VIEIRA, J. B. F., 1993. O programa brasileiro de controle da esquistossomose. IV Simpósio Internacional de Esquistossomose. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz. (Mimeo.)

VITORINO RR, SOUZA FPCD, COSTA ADP, FARIA JÚNIOR FCD, SANTANA LA, GOMES AP. Esquistossomose mansônica: diagnóstico, tratamento,

epidemiologia, profilaxia e controle. **Revista Brasileira Clínica Médica**. 2010 janfev;10(1):39-45.

WHO. Schistosomiasis: population requiring preventive chemotherapy and number of people treated in 2015. **Wkly Epidemiological Records** 2012; 87: 37-44

WOLPERT, L. Princípios de biologia do desenvolvimento. Porto Alegre: **Artigo Medicina**, 2000,434p.