

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE E DA VIDA
MESTRADO EM ECOLOGIA E EVOLUÇÃO DA BIODIVERSIDADE

RENATA PEROTTO DE SOUZA

**ESTUDO DA DINÂMICA DE INTERAÇÃO E TRANSMISSÃO DA ESQUISTOSSOMOSE
MANSÔNICA:**

A importância do miracídio de *Schistosoma mansoni*

Porto Alegre

2021

PÓS-GRADUAÇÃO - STRICTO SENSU



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE E DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E EVOLUÇÃO DA
BIODIVERSIDADE - MESTRADO

RENATA PEROTTO DE SOUZA

**ESTUDO DA DINÂMICA DE INTERAÇÃO E TRANSMISSÃO DA
ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA:**

A importância do miracídio de *Schistosoma mansoni*

Porto Alegre

2021

RENATA PEROTTO DE SOUZA

**ESTUDO DA DINÂMICA DE INTERAÇÃO E TRANSMISSÃO DA
ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA**

A importância do miracídio de *Schistosoma mansoni*

Dissertação apresentada para a
obtenção do grau de mestre pelo
programa de Evolução e Ecologia
da Biodiversidade – Escola de
Ciências da Saúde e da Vida da
Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

Orientadora: Dra. Laura Roberta Pinto Utz

Co-orientador: Carlos Graeff Teixeira

Porto Alegre

2021

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à professora Dra. Laura Roberta Pinto Utz, que assumiu minha orientação e me acompanhou na maior parte do mestrado, me auxiliando e me guiando sempre de forma positiva. Ao Dr. Carlos Graeff Teixeira que me orienta desde a iniciação científica, sempre me motivando a aprender, contribuindo para meu crescimento profissional e pessoal, e no qual me permitiu o desenvolvimento deste projeto, estando presente em todas as etapas.

À Vanessa Fey Pascoal, todo meu agradecimento pelo apoio durante estes dois anos, me ajudando com tudo o que necessitei, bem como pelo apoio moral e a animação dentro do laboratório. Também deixo minha consideração a todas as pessoas que passaram no Laboratório de Biologia Parasitária da PUCRS durante o tempo em que estive, em especial a Dra. Vivian Favero que me ensinou muito, e este conhecimento foi fundamental para que eu conseguisse realizar o mestrado.

Agradeço ao Dr. Thomas Vilches e ao Prof. Dr. Hyan que me ajudaram a entender os processos matemáticos da modelagem, estando dispostos a me explicarem os processos quando preciso. Também ao Dr. Daniel Acosta Avalos que me acompanhou para os testes de biomagnetismo em todas as etapas. E ao professor Hélio Radke que contribuiu com as análises estatísticas.

Das pessoas que estiveram do meu lado meus mais sinceros agradecimentos, destacando meus pais, Sílvia e Renato, que estiveram ao meu lado me apoiando e me permitiram realizar esta etapa em minha carreira profissional. Aos meus avós maternos, Sueli e “Perotto”, que independente do que eu fazia eram as pessoas que sempre me apoiaram e tiveram orgulho de mim. E finalmente, aos meus três anjos de quatro patas que tiveram que me aguentar durante a pandemia e durante os meus surtos sentimentais, me ajudando a me manter estável. Ao meu companheiro Rodrigo, o qual me ajudou durante alguns processos computacionais, estando sempre disposto a me auxiliar. E por fim, a todas minhas amigas que estiveram ao meu lado ouvindo meus desabafos. Muito Obrigada.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ciclo biológico do *S. mansoni*. Fonte: Adaptado pelo Laboratório de Biologia Parasitária da PUCRS 14
- Figura 2.** Imagem de microscopia eletrônica do miracídio de *S. mansoni*. (Retirado e adaptado de <http://www.collinslab.org/>, acesso em 26 de maio de 2019) 16
- Figura 3.** Estruturas de locomoção do miracídio de *S. mansoni*. A) Cílios; B) Filamentos contráteis. Fonte: Adaptado de Bahia, 2006. 17
- Figura 4.** Representação ilustrativa do campo magnético terrestre. As linhas do campo magnético estão representados (\rightarrow), juntamente com os polos geográficos Norte (N) e Sul (S), representados pela linha ---, e os polos magnéticos Norte (Nm) e Sul (Sm) pela linha vermelha. Fonte: Adaptado de Shaw et al., 2015. 25
- Figura 5.** Representação esquemática do monitoramento da movimentação dos miracídios de *S. mansoni*. A. Primeira observação, a cada uma hora em 3 diferentes ambientes. B. Observação a cada meia hora em 4 diferentes ambientes. 35
- Figura 6. A** Foto da bobina de Helmholtz, conectada à fonte, e com adaptação de uma lupa estereoscópica, sendo posicionado na mesa da lupa a placa de poços côncavos, e ao lado uma bússola. **B.** Tempo de filmagem de acordo com a exposição ao campo magnético, sendo avaliado um minuto de cada filmagem pelo programa ImageJ. 38
- Figura 7.** Trajetos dos miracídios de *S. mansoni* quando (A) bobina desligada, (B) bobina ligada e (C) bobina desligada. Cada cor de linha representa o trajeto individual de um miracídio ao longo do monitoramento. 39
- Figura 8.** Interface do modelo em NetLogo. Na interface que representa o “ambiente”, há a representação dos caramujos em marrom (caramujos infectados representados pelo interior vermelho, e os caramujos não infectados pelo interior branco). Os miracídios são representados por forma circular branca. Em azul o muco diluído do caramujo. Nos sliders são os valores dos parâmetros ambientais (temperatura, luminosidade e viscosidade), parâmetros dos agentes: 1) caramujos (número inicial da população, diluição do atraente);

2) miracídios (número inicial da população, energia inicial, percentual de caminho, angulação do movimento, sensoriamento do atraente).	41
Figura 9. Ilustração de parte do código na linguagem NetLogo (Anexo 1). A função "to go" invoca os comandos a cada corrida do código. O "if" implica em uma condição, onde o resultado é determinado pelo []. A função "ask" relaciona a condição ao agente "miracidia". O comando "stop" determina o encerramento da corrida.	42
Figura 10. Gráfico de probabilidade de sobrevivência dos miracídios de <i>S. mansoni</i> ao longo do tempo (horas) nos diferentes grupos. Câmara climática (bordô), ambiente (verde) e ambiente escuro (azul).	45
Figura 11. Probabilidade de sobrevivência dos miracídios de <i>S. mansoni</i> , em horas. Cada linha representa os seguintes grupos: Câmara Climática (verde), Câmara Climática sem luz (vermelho), Ambiente (azul) e Ambiente Escuro (roxo).	46
Figura 12. Boxplot da infectividade dos miracídios de <i>S. mansoni</i> , em horas, das observações a cada hora, dos diferentes grupos: Câmara Climática (verde), Ambiente (roxo) e Ambiente Escuro (azul). O afunilamento em cada box representa a mediana do grupo.	47
Figura 13. Frequência das categorias dos movimentos dos miracídios de <i>S. mansoni</i> observados a cada uma hora durante 9 horas. As categorias de movimentação são: velocidade máxima (amarelo), rápido (verde), letárgico (azul), devagar (azul petróleo), parado com movimento ciliar (azul) e parado sem movimento ciliar (roxo).	48
Figura 14. Boxplot da infectividade em horas dos miracídios de <i>S. mansoni</i> nos diferentes ambientes: câmara climática (lilás), câmara climática sem luz (laranja), ambiente (verde), ambiente escuro (azul claro).	49
Figura 15. Frequência das categorias dos movimentos dos miracídios de <i>S. mansoni</i> observados a cada meia hora durante 10 horas. As categorias de movimentação são: velocidade máxima (amarelo), rápido (verde), letárgico (azul), devagar (azul petróleo), parado com movimento ciliar (azul) e parado sem movimento ciliar (roxo).	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação entre velocidade, angulação e temperatura de miracídios de <i>S. mansoni</i> conforme descritos na literatura.	19
Tabela 2. Registro de tempo de vida e infectividade de miracídios de <i>S. mansoni</i> de acordo com a temperatura, segundo dados da literatura.	20
Tabela 3. Categorias estabelecidas pré observações de movimentação do miracídio de <i>S. mansoni</i>	32
Tabela 4. Média de longevidade, em horas, dos miracídios de <i>S. mansoni</i> observados a cada uma hora e separados em três: Ambiente, Ambiente Escuro, Câmara Climática) e todos juntos.	44
Tabela 5. Média de sobrevivência, em minutos, dos miracídios de <i>S. mansoni</i> monitorados a cada meia hora. Avaliou-se os grupos individualmente (Ambiente, Ambiente Escuro, Câmara Climática e Câmara Escura), e todos os indivíduos juntos.	46
Tabela 6. Valores de p para os parâmetros de Velocidade, Frequência de rotação e raio para cada vídeo, e os valores de p de acordo com o teste de Dunn comparando pré exposição e pós exposição à bobina (D1-D2), pré exposição e com bobina ligada (D1-L) e pós exposição e bobina ligada (D2-L) para os valores de frequência de rotação e de velocidade média que foram diferentes significativamente.	51

LISTA DE ABREVIATURAS

OMS – Organização Mundial da Saúde

WHA – Assembleia Mundial da Saúde

SUS – Sistema Único de Saúde

PZQ – Praziquantel

KK – Kato Katz

HTX – Helmintex

ABM – Modelagem Baseada em Agentes

GPCR – Receptores acoplados à proteína G

FREP - Proteínas relacionadas ao fibrogênio

MIF – Fatores de inibição de macrófagos

CM – Campo magnético

CMT – Campo magnético terrestre

MTB – Bactérias magnetotáticas

PopS = Tamanho inicial da população de caramujos

PopM = Tamanho inicial da população de miracídios

LISTA DE SÍMBOLOS

Fe_3O_4 – Magnetita

Fe_3S_4 – Greigite

RESUMO

A esquistossomose mansônica, no Brasil, tem maiores focos na região Nordeste, sendo o clima tropical da região um importante fator para sua transmissão. Dos estágios de desenvolvimento, apenas as formas larvais miracídios e cercárias são infectantes aos seus respectivos hospedeiros, caramujo e o homem. Por ser uma parasitose que afeta mais de 200 milhões de pessoas, a Organização Mundial da Saúde designou a esquistossomose como um problema de saúde pública global, sobressaltando a necessidade de medidas de interrupção da transmissão. O objetivo deste trabalho é estudar a dinâmica entre o miracídio de *S. mansoni* e seu hospedeiro intermediário, o molusco de gênero *Biomphalaria*, de acordo com a perspectiva de transmissão. Para estimar a longevidade e infectividade, estabeleceram-se categorias de movimentação, onde observou-se o comportamento dos miracídios durante 10h em quatro ambientes: câmara climática, câmara sem luz, em ambiente com luminosidade e ambiente escuro. A sobrevivência média dos animais foi de 3h30 enquanto a infectividade média foi de 2h, sem diferença observada entre os quatro tipos de ambientes ou entre ambiente com ou sem luminosidade. A partir dos dados de interação entre o miracídio e o caramujo retirados da literatura, construiu-se pela linguagem NetLogo uma modelagem para simular esta dinâmica em relação ao tamanho populacional entre agentes. Das simulações observou-se que a média de infecção aumentava proporcionalmente ao aumento da população inicial de caramujos e de miracídios. Também, avaliou-se o efeito do campo magnético sobre a movimentação dos miracídios, por meio de uma bobina de Helmholtz, que gerou um campo homogêneo local, a qual os miracídios permaneceram expostos por 5 minutos, registrando por imagens o movimento pré-exposição, durante exposição e pós-exposição. Os miracídios apresentaram diferença significativa ($p=0,03$) em sua cinemática após exposição à bobina de Helmholtz.

Palavras Chaves: *S. mansoni*; motilidade; miracídio; parasito-hospedeiro;

ABSTRACT

In Brazil, the schistosomiasis *mansoni* has the highest focus on the Northeast region, being the local climate an important factor for the disease transmission. Of six stages of development, only the miracidia and cercariae are infectant for their respective hosts, the snail, and humans. The schistosomiasis affects more than 200 million people, and the World Health Organization set it as a global public health problem, highlighting the need of actions to transmission's interruption. The aim of this work is study the dynamics between *S. mansoni* miracidium and its intermediate host, the mollusc genus *Biomphalaria*, accordingly with the transmission perspective. To establish the longevity and infectivity, six types of movements were categorized, and they were observed for 10 hours in four types of environments: climatic chamber, climatic chamber without light, environment with light and environment without light. Miracidia lifespan was 3h30 and the infectivity was 2h, both parameters have not differed significantly between the four environments or environments with and without light. Using data of miracidia and snail interaction from the literature, a model to simulate their dynamics related with their populational size was built by NetLogo language. In the simulations the infected snails rate increased proportionally with the increase of miracidia and snail initial population size. Also, the magnetic field effect in miracidia movements was evaluated using a Helmholtz's coil. The coil generated a homogeneous and local field where miracidia remained exposed for five minutes, being recorded pre-exposure, exposure, and post-exposure movements. The miracidia's kinematics presented significative difference ($p=0.03$) after exposure to Helmholtz's coil.

Keywords: *S. mansoni*; motility; miracidium; transmission dynamics;

Sumário

1. INTRODUÇÃO GERAL	10
1.1. Esquistossomose.....	10
1.2. <i>Schistosoma mansoni</i>	12
1.3. Miracídio.....	15
1.4. Mobilidade do Miracídio.....	18
1.5. Interação entre Miracídio e <i>Biomphalaria sp.</i>	20
1.6. Infecção de caramujos <i>Biomphalaria sp.</i>	22
1.7. Biomagnetismo	24
2. JUSTIFICATIVA.....	28
3. OBJETIVOS	30
4. METODOLOGIA	31
4.1. Obtenção de Miracídios.....	31
4.2. Movimentação Através do Tempo	31
4.3. Infectividade	35
4.4. Influência do Campo Magnético no movimento de Miracídios.....	36
4.5. Modelagem Baseada em Agentes.....	39
4.6. Análise Estatística	42
5. RESULTADOS.....	44
5.1. Movimentação Através do Tempo	44
5.2. Infectividade	46
5.3. Modelagem Baseada em Agentes.....	50
5.4. Influência do campo magnético no movimento dos miracídios.....	50
6. DISCUSSÃO	52
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
8. ANEXOS	66
8.1. Código do modelo na linguagem NetLogo	66
8.2. Tabela de valores de parâmetros dos tamanhos populacionais das simulações.....	70

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Esquistossomose

A esquistossomose é uma parasitose associada aos países subdesenvolvidos, principalmente em regiões em que a pobreza predomina, havendo pouco ou nenhum recurso de saneamento básico ou fornecimento de água potável, bem como o turismo para áreas com transmissão ativa (1). Mundialmente, a esquistossomose afeta cerca de 240 milhões de pessoas, sendo estimado que 700 milhões vivem em área endêmica (2). Geograficamente, a esquistossomose é encontrada em regiões tropicais, destacando-se a África, com o maior número de casos e de intensidade de infecções, e América latina. As maiores prevalências encontradas nas regiões de clima tropical, perto da linha equatorial. No Brasil, a esquistossomose ocorre principalmente na região nordeste, com áreas de foco ou de casos isolados nas demais áreas do país (3).

A infecção de humanos pela esquistossomose decorre pelo contato com água contaminada durante atividades recreativas, ocupacionais, domésticas e durante atividades agrícolas (4). Quando a cercária penetra a pele, acaba perdendo sua cauda, podendo causar dermatite. Na maioria dos casos, a fase aguda da esquistossomose mansônica é assintomática, no entanto pode haver manifestações como febre, dor de cabeça, calafrios, sudoreses, fraqueza, falta de apetite, dores musculares, tosse e diarreia. Na fase crônica, há o aumento do volume do fígado e do baço, emagrecimento, tontura, prurido anal, palpitações e fraqueza (5). Sintomas severos são causados pelo aumento da pressão venosa no sistema mesentérico devido à fibrose perivascular nos tecidos hepáticos (6).

Para realizar o diagnóstico de esquistossomose há os métodos diretos, que confirmam a infecção ativa pela visualização dos ovos em amostras fecais, e os métodos indiretos, principalmente por detecção de anticorpos (sorologia), que não necessariamente indicam infecção ativa, pois detectam a resposta imunológica que pode permanecer mesmo após a eliminação do patógeno (7). Há controvérsias se a detecção de ácidos nucleicos e de antígenos pode ser base de diagnóstico confirmado. Os métodos diagnósticos para

esquistossomose devem fornecer a confirmação da infecção, bem como sua intensidade, pois a partir destes dados e da prevalência de uma população consegue-se estabelecer a endemicidade da parasitose e a definição das medidas de controle mais adequadas (8). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceu os métodos de diagnóstico direto como métodos de referência. Para verificação de infecção em populações, é recomendado o método Kato-Katz (KK), que possui alta sensibilidade para áreas de alta endemicidade, baixo custo, e fácil aplicação em campo. Contudo, em áreas de média e baixa endemicidade a sensibilidade do método KK diminui significativamente, apresentando resultados falsos negativos. O método Helmintex (HTX), possui maior sensibilidade que os demais métodos, sendo 100% sensível para cargas de até 1,34 ovos por grama de fezes (9), porém apresenta difícil aplicação em campo, devido necessitar estrutura laboratorial e ser mais demorado e laborioso que os demais métodos, de forma que é recomendado como método de referência para a avaliação de performance de outros métodos de diagnóstico (10).

O tratamento para esquistossomose mansônica é realizado pela ingestão de dose única do anti-helmíntico praziquantel (PZQ). No Brasil, o tratamento pra esquistossomose só é realizado mediante apresentação de diagnóstico por detecção de ovos, sendo o PZQ distribuído somente via o Sistema Único de Saúde (SUS), necessitando que um profissional de saúde acompanhe o paciente por cerca de duas horas, afim de prestar atendimento caso haja efeitos adversos (11). Em 2017, a cobertura do tratamento para as esquistossomoses era de apenas 44,9% da população que necessita de tratamento, sendo que desta porcentagem, 88,3% dos tratamentos fornecidos foram destinados às regiões africanas (12).

A prevenção ocorre por medidas de intervenção, onde deve-se realizar o tratamento de indivíduos infectados. Para a comunidade afetada, a educação sobre a esquistossomose deve ser feita, principalmente para crianças, ensinado ações preventivas, como não se banhar em ambiente contaminado, não defecar em áreas próximas ou no próprio rio, bem como utilizar calças e botas em possíveis áreas de contaminação. Um terceira ação de fundamental importância, é o acesso a saneamento básico e o fornecimento de água potável, reduzindo

a exposição à águas contaminadas por atividades domésticas, agropecuárias ou de lazer (5).

Na Assembleia Mundial de Saúde, do inglês *World Health Assembly* (WHA) realizada em 2001 pela OMS, aprovou-se a resolução WHA 54.19, em que definiu-se a esquistossomose como problema de saúde pública, sendo determinado o tratamento coletivo sem diagnóstico prévio em áreas de alta endemicidade como forma de medidas para redução de morbidade da parasitose (13). Na resolução WHA 65.21, aprovada em 2012, países participantes, inclusive o Brasil, assumiram o compromisso de eliminar a esquistossomose como problema de saúde pública, sendo ressaltado o objetivo de eliminação da transmissão, para isto foi proposto a redução da prevalência para menos de 5% até 2020. Também foi destacada a necessidade do desenvolvimento de métodos de diagnóstico mais sensíveis para áreas de baixa endemicidade, determinando como meta a interrupção da transmissão da esquistossomose (14). No *Road Map 2021 a 2030*, manteve-se a meta de eliminação da esquistossomose como problema de saúde pública, sendo sugerido como planos de ação medidas de medição de morbidade, desenvolvimento de novos diagnósticos e novas intervenções e medidas de controle de caramujos, bem como suas respectivas aplicações (15).

1.2. *Schistosoma mansoni*

O gênero *Schistosoma* pertence à família Schistosomatidae, ordem Strigeiformes, subclasse Digenea, classe Trematoda e filo Platyhelminthes. Diferentemente dos demais trematódeos, o *Schistosoma* apresenta reprodução sexuada, com dimorfismo sexual entre os indivíduos. Deste modo, em formas larvais já há definição sexual, porém a diferenciação morfológica é de difícil reconhecimento a olho nu, sendo possível distinguir apenas em indivíduos adultos.

Os digenéticos parasitos são caracterizados por possuírem um ciclo biológico heteroxênico, ou seja, possuem dois hospedeiros ao longo de sua vida. Para o *Schistosoma mansoni*, o hospedeiro intermediário são caramujos do gênero *Biomphalaria*, enquanto o hospedeiro definitivo são alguns mamíferos, principalmente humanos (Figura 1).

Quando fezes contendo ovos de *S. mansoni*, entram em contato com o meio aquático, os ovos se separam das fezes, onde em condições ambientais de temperatura acima de 22°C, com alta luminosidade e meio de baixa salinidade, há a eclosão dos miracídios. Os miracídios nadam a fim de encontrar uma *Biomphalaria*, penetrando principalmente no pé musculoso do molusco. Em seguida, o miracídio começa a transformar-se em esporocisto primário, o qual sofrerá uma transformação para esporocisto secundário. Quando em forma de esporocisto, há reprodução assexuada para a formação de cercárias, sendo que um esporocisto pode originar cerca de 200 mil cercárias. Em cerca de 30 dias após a infecção do caramujo, as cercárias começam a ser liberadas na água, estimuladas pelas condições ambientais de alta luminosidade e temperatura de 25 a 27°C. Devido a cercária possuir uma cauda bifurcada, nadam ativamente em busca de um hospedeiro definitivo. Ao encontrar o homem, as cercárias liberam enzimas para conseguirem penetrar a pele, processo que resulta na perda da cauda e na transformação de esquistossômulos. Por sua vez, os esquistossômulos podem levar cerca de 8 minutos a 48 horas para chegar a corrente sanguínea. Ao chegarem à veia porta, os esquistossômulos começam o seu desenvolvimento até atingirem a forma adulta.

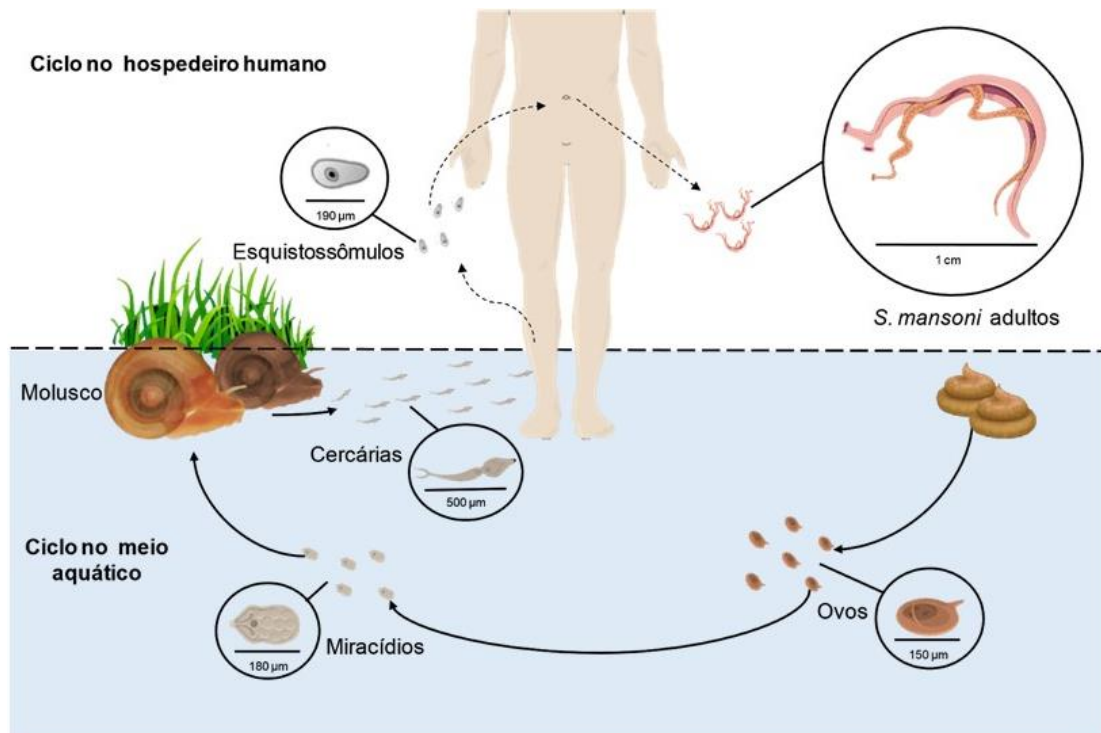


Figura 1. Ciclo biológico do *S. mansoni*. Fonte: Adaptado pelo Laboratório de Biologia Parasitária da PUCRS

Os vermes formam casais, que fazem a troca de gametas para reprodução sexuada. A fecundação dos ovos ocorre no oviducto da fêmea, sendo a fosforilação oxidativa mitocondrial e o catabolismo de ácidos graxos fundamentais para a produção dos ovos (16). A produção e formação dos ovos é estimulada pela presença dos machos, sendo que estes promovem o desenvolvimento das estruturas reprodutivas das fêmeas (17). Para a postura, a fêmea ainda em par com o macho, migra até as veias mesentéricas inferiores, onde libera os ovos na veia, e estes tendo que passar pelo tecido da parede intestinal até chegar ao lúmen do intestino, onde são misturados ao bolo fecal.

A quantidade de ovos presente nas fezes do hospedeiro vertebrado pode variar de acordo com a quantidade de casais formados no hospedeiro. Em cultivo *in vitro* de vermes, a produção máxima de ovos por fêmea é de 30 a 78 ovos por dia, variando de acordo com o meio de cultura (18). Dos ovos postos, a taxa de ovos maduros é em média de 39,9%, e a taxa de ovos que atingem maturidade é de 16,5 a 36,6% (19,20). Em cultivo também, observou-se que a produção inicia com baixa quantidade de ovos, em seguida atinge o número máximo de

ovos produzidos, e então sofre uma redução, esta variação de produção é relacionada com a queda na produção de esperma masculino, estando relacionada com recursos energéticos, o meio, estresse do indivíduo e a sobrevivência do verme (21). Na infecção experimental de roedores, a produção diária de ovos por casal foi de 300 a 350 ovos por casal (22,23).

Para chegar ao meio aquático, os ovos têm que passar, pela parede do intestino, onde cerca de 50% dos ovos ficam retidos, sendo respectivamente 32% no intestino delgado e 18% no intestino grosso, e cerca de 2% dos ovos são encontrados no mesentério (23). Além de ficarem retidos nos tecidos do trato gastrointestinal, com o fluxo sanguíneo, cerca de 26% são levados ao fígado, onde a resposta inflamatória do hospedeiro causa a formação dos granulomas ao redor do ovo (24). Por conseguinte, apenas aproximadamente 1/3 dos ovos produzidos conseguem chegar às fezes (22). Em alguns casos, alguns ovos migram pelo sistema venoso, chegando à medula espinhal, ocasionando tumoração inflamatória, desenvolvendo o quadro clínico de neuroesquistossomose, sendo um fenômeno independente de carga parasitária muito elevada (25).

1.3. Miracídio

Possuindo uma forma oval piriforme, os miracídios apresentam um tamanho entre 150 a 180 μm e largura de 60 a 75 μm , sendo estas medidas variáveis de acordo com diferentes isolados geográficos (26). Apesar de não apresentarem estruturas oculares, utilizam-se de um mecanismo desconhecido que lhe confere o comportamento de fototropismo positivo para se guiar em movimentação (27). Os miracídios são completamente revestidos por cílios (Figura 2), possuindo 21 placas ciliares distribuídas pelo corpo. Os cílios possuem cerca de oito micrômetros de comprimento e dois micrômetros de raiz, e sua composição se dá por 9 faixas de microtúbulos duplos externos e um microtúbulo duplo central (28). Na parte apical encontra-se uma papila, denominada de terebratorium, que são pregas anastomosadas do tegumento. No terebratorium há a presença da glândula apical, que possui grande concentração de receptores sensitivos, e em sua borda lateral há um par de glândulas adesivas (29,30). Os cílios são responsáveis pela locomoção da larva,

assim enquanto vivos, há uma constante movimentação, que só cessa quando o indivíduo morre.

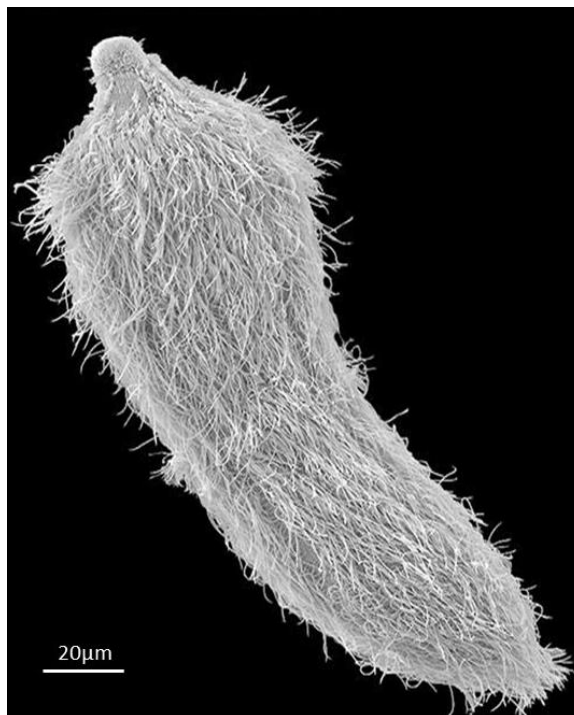


Figura 2. Imagem de microscopia eletrônica do miracídio de *S. mansoni*. (Retirado e adaptado de <http://www.collinslab.org/>, acesso em 26 de maio de 2019)

Os filamentos contráteis são compostos por actina, havendo também miosina em sua composição. Portanto, os músculos apresentam-se agrupados em 6 fitas longitudinais, com espessura entre 2,4 a 4,3 μm de largura, e o espaçamento entre as fitas é de 2 a 5 μm . Cada fibra muscular tem cerca de 4 μm de espessura, estando distribuídas em 7 a 8 sessões, havendo um distanciamento de 8,2 μm entre os túbulos. A camada de músculos circulares possui 1 μm de espessura com intervalos de 1,4 μm entre cada (Figura 3). Na região posterior e superior do corpo do miracídio, há a presença de massa neural (DAPI), a qual apresenta núcleo de células, e onde os feixes musculares começam a divergir em sua distribuição. Também, os túbulos de actina estão co-localizados com as células flamas, onde juntos se distribuem em dois pares dispostos nas laterais do miracídio (28,31).

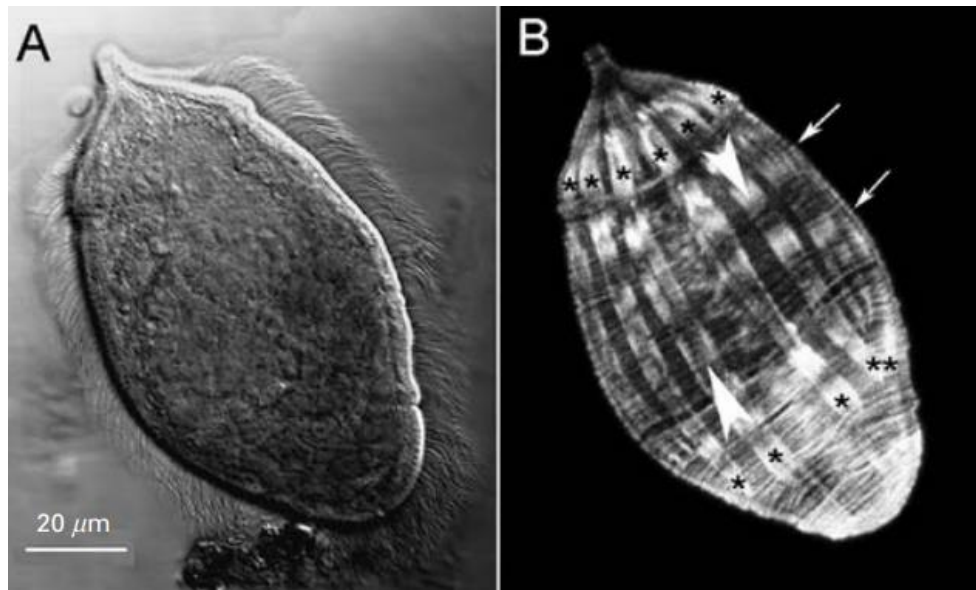


Figura 3. Estruturas de locomoção do miracídio de *S. mansoni*. A) Cílios; B) Filamentos contráteis. Fonte: Adaptado de Bahia, 2006.

Possuindo metabolismo energético aeróbico, os miracídios degradam o carboidrato para a cadeia de fosforilação oxidativa, onde consomem baixas quantidades de oxigênio presente no ambiente e produzem quantidades consideráveis de lactato. No entanto, a maior fonte energética é o consumo de substratos endógenos como os triacilgliceróis e, principalmente, o glicogênio (32). Estes substratos são provenientes de células vitelínicas produzidas pela fêmea, sendo a produção e disponibilização deste recurso energético, influenciado pela transcrição do peptídeo p14, e indiretamente pela presença de machos e o pareamento dos vermes (33).

Para platelmintos já se foi identificado a presença de receptores acoplados a proteína G (GPCRs), que são relacionados com a sensibilidade de fatores ambientais e químicos. Para vermes adultos de *S. mansoni* se encontrou 117 GPCRs, nos quais os mais abundantes são os de rodopsina, sendo que estes receptores podem controlar o movimento do indivíduo (34,35). Nos miracídios pode-se encontrar 17 genes para GPCRs do tipo rodopsina, sendo que apenas 9 são expressos, acreditando-se que estes são responsáveis pela resposta do miracídio em relação a luz, bem como pela procura e reconhecimento de caramujos (36).

A determinação do sexo do indivíduo de *S. mansoni* ocorre durante a meiose no ducto reprodutivo feminino, assim iniciando o processo de formação do miracídio e do ovo, onde pós postura ocorrem mais seis estágios até a formação do miracídio maduro (37,38). Na formação do ovo, há cerca de 20 a 30 células vitelinas, precursoras do miracídio, e ainda sem um indivíduo formado, pode-se observar a organização celular de mitocôndrias e retículos endoplasmáticos rugoso, indicando atividade metabólica e atividade sintática proteica, respectivamente. No ovo maturo observa-se o miracídio completamente formado no interior, e a camada de Reynolds, também designada como envelope exterior do ovo, atinge espessura mínima para facilitar a eclosão dos miracídios (39,40).

A eclosão do miracídio ocorre primeiramente pela movimentação das células flamas, seguida pela contração do miracídio no interior do ovo, para que então comece a movimentação ciliar, que inicia na porção anterior até que todos os cílios estejam ativos, e por fim há a ruptura da casca (41). A eclosão em condições ideais ocorre em cerca de dois a três minutos, sendo o tempo e o padrão de ruptura da casca, influenciados diretamente pela luminosidade incidente, temperatura e salinidade do meio aquático, as quais devem ocorrer respectivamente em alta e baixa quantidade, para fornecer um ambiente propício à eclosão (42,43). Após eclosão os miracídios, em ambiente aquático, nadam ativamente até encontrar um hospedeiro ou então morrer.

1.4. Mobilidade do Miracídio

O direcionamento do nado do miracídio é linear, e casualmente curvando-se devido a obstáculos. É estimado que em condições aquáticas ideais, a velocidade média do miracídio é de aproximadamente 2,5 mm/seg quando em temperatura de 22°C, e sua velocidade angular encontra-se entre 50,8 a 75,8°/seg (44). Em plano vertical, os miracídios realizam um movimento ondulatório com amplitude de 0,4 mm a cada 3 segundos (45). Na água, os miracídios se encontram em maior densidade em locais com maior luminosidade, geralmente sendo a fração superior da coluna d'água, mas no entanto, estes tem a capacidade de se guiar em áreas escuras, muitas vezes se distribuindo uniformemente ao longo da coluna d'água (46).

Tabela 1. Relação entre velocidade, angulação e temperatura de miracídios de *S. mansoni* conforme descritos na literatura.

Temperatura	Velocidade	Velocidade/10°C	Velocidade Angular	Água	% Água condicionada de caramujo	Referências
22°C	2,5 mm/seg	± 1,23 mm/seg	30°/seg	Água de poço	-	Samuelson, 1984
22°C	2,4 mm/seg	-	300°/seg	Água condicionada de caramujo	100%	Samuelson, 1984
-	2 mm/seg	-	75.8 ± 50.8°/seg	Água de Nascente	-	Roberts, 1979
-	2,27 mm/seg	-	86.4 ± 50.5°/seg	Água condicionada de caramujo	0.5x SCW	Roberts, 1979
20 - 22°C	2,33 ± 0,31 mm/seg	0,7 mm/seg	54°/seg	Água	-	Mason, 1976
20 - 23°C	1,66 ± 0,25 mm/seg	-	58°/seg	Água Destilada	-	Mason, 1977
20 - 23°C	2,66 ± 0,47 mm/seg	-	64°/seg	Água condicionada de caramujo	5%	Mason, 1977
22 a 28°C	Ativo: 2 mm/seg Letárgico: 0,9 mm/seg e Devagar: 0,4 mm/seg	-	-	-	-	Prah, 1978 I

O movimento ciliar ocorre de acordo com a energia que o miracídio possui, logo, ao passo que a taxa metabólica aumenta, a reserva energética se extingue mais rápido, e por conseguinte, a mobilidade e tempo de vida do miracídio é reduzido. O valor de Q_{10} , coeficiente de variação da taxa metabólica a cada 10°C, varia entre as cepas de *S. mansoni*, sendo a faixa de temperatura estável sempre superior a 20°C (47).

Maldonado, em 1948, estipulou que o tempo médio de vida de um miracídio em temperatura de 22°C, é de cinco a seis horas, havendo poucos indivíduos que sobrevivem até mais de 12 horas (48). Contudo, Benex em 1963, determinou que em temperatura de 22 a 25°C miracídios vivem entre 7 a 9 horas, e conseguem viver por mais de 24 horas quando em temperaturas menores que 5°C, porém em temperaturas superiores a 30°C estes não ultrapassam mais que uma hora de vida (49). A temperatura também influencia na capacidade de infecção, onde em temperaturas abaixo de 10°C a taxa de infecção é nula, e

quando em temperaturas de 20 a 30°C há a melhor performance de infectividade do miracídio. A infectividade de um miracídio decai de acordo com seu tempo de vida, sendo descrito uma infectividade geral de 2/3 em até 2h (50). No entanto, segundo Chernin apenas 40% dos miracídios possuem capacidade total de infectar e dar origem ao esporocisto, e o restante não é infectante ou é incapaz de se desenvolver pós penetração, sendo que a infectividade dos miracídios começa a reduzir após sete horas de vida, havendo alguns indivíduos que em quatro horas já não são infectantes (51,52). No entanto, os valores de longevidade, infectividade e movimentação são variáveis de acordo com os isolados geográficos.

Tabela 2. Registro de tempo de vida e infectividade de miracídios de *S. mansoni* de acordo com a temperatura, segundo dados da literatura.

Sobrevida	Infectividade	Temperatura	Água	Referências
Até 15h	70 a 100% até 8h	22 - 28°C	-	Prah, 1978 I
5 - 6 h	66,6% até 2h	-	Água da chuva	Maldonado 1948
7 - 9 h	-	20 - 25°C	-	Benex, 1963
-	4h	23 - 25°C	Água Filtrada	Chernin, 1968
-	59 - 100%	23 - 25°C	Água da torneira	Stirewalt, 1954
-	30%	25 - 27°C	Água	Chernin, 1975
-	72,2 a 80%	24 - 26°C	-	Prah, 1978 III

1.5. Interação entre Miracídio e *Biomphalaria* sp.

As condições ambientais são moduladoras da interação entre o miracídio e a *Biomphalaria*, alterando principalmente o comportamento do miracídio. Desta forma, a temperatura influencia proporcionalmente na taxa de eclosão, no tempo de eclosão e na velocidade do miracídio. A medida que a temperatura aumenta, quando combinada com uma baixa viscosidade, há um aumento na velocidade e uma diminuição do tempo de vida, que é compensado pelo aumento da performance de locomoção, que por fim aumenta a probabilidade de infecção (53). A salinidade do meio, além de diminuir consideravelmente a taxa de eclosão, diminui a velocidade dos miracídios para 0,1 mm/seg (43). A taxa de infecção também é influenciada pelos fatores ambientais, sendo que quando combinados, o pH, a salinidade e a turbidez da água produzem uma pequena redução no número de caramujos infectados (54).

Para encontrar o hospedeiro intermediário, em seu relativo pouco tempo de vida, o miracídio utiliza de diversas estratégias, onde ao perceber algum estímulo mecânico, químico ou luminoso, ativando movimentação direcionada (taxia) ou não direcionada (cinese). Dos mecanismos utilizados, destaca-se a fototaxia (orientação determinada por estímulos luminosos) e quimiotaxia (comportamento do indivíduo influenciado por substâncias químicas). As moléculas presentes na água condicionada de caramujo (SCW, do inglês *snail-conditioned water*) desencadeiam uma alteração no comportamento do miracídio dependendo da concentração, tornando seu direcionamento aleatório e seu movimento circular. O efeito de macromoléculas de glicoproteínas secretadas pela *Biomphalaria* tem sido amplamente estudado, sendo liberados pelo muco, e difundido na área ao seu redor, demarcando seu espaço ativo. Esta secreção é um composto de *kairomones*, que são aleloquímicos que desencadeiam uma resposta fisiológica ou comportamental para o organismo receptor, desta forma o principal componente emitido pela *B. glabrata* é o peptídeo P12, sendo específico para a espécie (55). O reconhecimento de *kairomones* desencadeia uma rápida resposta nos miracídios, causando uma desaceleração do movimento, o aumento da tortuosidade e do desvio angular, que aumenta para 300°/seg, fazendo com que o miracídio assuma uma movimentação circular (44). A SCW, quando apresenta tamanho superior a 30kDa, aumenta o “contato com retorno” bem como “investigação repetida” (56). Além da mudança de movimentação, os miracídios alteram a taxa de direcionamento, e menos de cinco minutos após expostos à SCW, aglomeram-se em torno do local com maior concentração da substância (57). Apesar dos miracídios possuírem um sistema sensorial capaz de reconhecer os glicoconjugados de caramujos, esta relação é pouco específica, pois são capazes de reconhecer caramujos, porém não há distinção ou preferência entre as espécies, sendo a especificidade de reconhecimento variável entre as cepas de *S. mansoni* (58).

A interação entre o caramujo e os miracídios também é determinada pelos seguintes fatores: o tamanho do hospedeiro, o número de miracídios por caramujo, o número da população de caramujos. Assim, estes aspectos determinam o tempo necessário de exposição para que aconteça a penetração na *Biomphalaria*, bem como a interferência na produção de cercárias (59).

Os miracídios e as *Biomphalarias* possuem antígenos e receptores de sacarídeos similares, o que auxilia o miracídio a evitar a resposta imune do caramujo durante o processo de infecção (60). A hemolinfa da *B. glabrata* apresenta glicoproteínas com grande variedade de N-glicanos, as quais são responsáveis pela reatividade cruzada com os glicoconjugados dos miracídios, e que portanto fornecem uma estratégia de mimetismo durante a infecção e a transformação do miracídio em esporocisto primário (61). Estes antígenos e glicoproteínas compartilhados, são incorporados também na membrana do esporocisto primário, porém em quantidade reduzida (Yoshino & Bayne, 1983).

1.6. Infecção de caramujos *Biomphalaria* sp.

Para que aconteça a infecção do caramujo, é necessário que o miracídio penetre o tecido musculoso do gastrópode. Este processo inicia com o miracídio primeiramente aderindo ao pé musculoso do caramujo, sendo que para isto, as papilas adesivas começam a secretar uma substância viscosa, enquanto o miracídio continua seu movimento circular com o intuito de pressionar seu corpo contra o do caramujo. Após, inicia-se a penetração, em que inicialmente a papila apical se alonga, produzindo uma substância digestiva das células epiteliais do tecido da *Biomphalaria*, abrindo uma fenda no tecido. O miracídio se projeta para o interior desta fenda, fazendo movimentos de contração e extensão muscular, e constantemente movimentando seus cílios até que todo seu corpo esteja dentro do músculo do caramujo, onde começa sua transformação em esporocisto primário (30). Os esporocistos podem ser encontrados no epitélio do manto, nos sinusóides do pé e nos tecidos das antenas de *Biomphalarias* (63).

A penetração do miracídio no tecido da *Biomphalaria* pode desencadear uma resposta de defesa, em que por meio de fatores de inibição de migração de macrófagos (MIF) presentes na hemolinfa há o encapsulamento do miracídio. Este encapsulamento impede que o miracídio se desenvolva, e após poucos dias de infecção, pela ação de proteínas relacionadas ao fibrogênio (FREPs), ocorre a destruição e a fagocitose do invasor (64,65).

A prevalência de infecção por *S. mansoni* para os caramujos varia de acordo com aspectos morfológicos do próprio molusco, isto pois em indivíduos juvenis e subadultos, com conchas de tamanho respectivos de 3-5 mm e 7-9

mm, a taxa de infecção é maior, diminuindo de acordo com o aumento da concha, isto é, quando o indivíduo chega na fase adulta (66). A presença de outros moluscos diminui a taxa de infecção da população de caramujos transmissores habituais, visto que miracídios tentam penetrar tanto os caramujos do gênero *Biomphalaria*, quanto os demais presentes no meio (67,68). Outra interação que pode reduzir cerca de 42% da infecção dos miracídios, é a co-infecção com o anelídeo *Chaetogaster limnaei*, o qual atua como predador dos miracídios e até mesmo das cercárias produzidas (69).

A mortalidade da população de hospedeiros intermediários aumenta após a infecção, sendo que indivíduos juvenis, com cerca de uma a duas semanas de vida, apresentam uma maior taxa de mortalidade, enquanto também apresentam as maiores taxas de infecção (70,71). A infecção altera aspectos fisiológicos dos hospedeiros, sendo que a taxa de crescimento e o diâmetro da casca diminuem, e os batimentos cardíacos por minuto aumentam (72,73). Os caramujos infectados também apresentam mudanças na produção de ovos e no tamanho das posturas, visto que o número de ovos por postura diminui, no entanto os ovos desenvolvem-se normalmente, sem anormalidades, atraso na eclosão de miracídios ou variação na taxa de mortalidade de embriões (63,74). Estas relações assumem maior ou menor intensidade de acordo com a espécie de *Biomphalaria*, porém sempre seguindo estes padrões de taxa de mortalidade e infecção relacionados com a idade, e redução do crescimento e produção de posturas. O comportamento dos caramujos infectados também é influenciado, de forma que os gastrópodes logo após a infecção, dão preferência para permanecer em locais com temperaturas mais baixas, entre 23 a 25°C (75,76).

A suscetibilidade de *B. glabrata* ao miracídio de *S. mansoni* é determinada por fatores genéticos, onde o gene responsável é recessivo ao gene de não suscetibilidade, e sendo este fenótipo associado aos de pigmentação e disposição dos tentáculos do caramujo (77). Dos fenótipos existentes, sabe-se que a não-suscetibilidade é dominante à suscetibilidade, sendo a heterogenia importante para a relação parasito-hospedeiro. Os caramujos juvenis apresentam de cinco a seis genes com múltiplos alelos, para o fenótipo de resistência, enquanto os adultos possuem apenas um gene com um alelo (78). Os fenótipos apresentam sensibilidade à temperatura, devido à expressão de

proteínas de choque térmico (HSP). Outros genes presentes em *Biomphalaria* que são importantes para o sucesso de infecção, são os genes de estresse, que se expressados antes da infecção, auxiliam o miracídio na penetração (79). Apesar dos fatores genéticos a susceptibilidade também pode variar de acordo com a cepa a qual a *Biomphalaria* é exposta.

1.7. Biomagnetismo

O campo magnético pode ser definido pela força magnética criada em torno de uma matéria a partir de uma corrente elétrica gerada pelo momento angular intrínseco (spin) em torno de um átomo da partícula elementar componente da matéria. O campo magnético (CM) de um átomo ou de um corpo têm capacidade de interagir com o CM externo, de forma que se possuem corrente elétrica em mesma direção, se atraem, ou caso contrário se repelem. A Terra possui seu próprio campo magnético (CMT), que como um ímã, apresenta dois polos que emitem as linhas de campo. Os polos magnéticos terrestres encontram-se invertidos aos polos geográficos, assim o polo Norte magnético coincide com polo Sul geográfico, e o polo Sul magnético com o Norte geográfico (Figura 4). A intensidade, direção e ângulo do campo geomagnético varia ao longo da superfície terrestre, e podem ser influenciadas por fatores externos, como o vento solar, que carrega de forma instável, partículas carregadas, que são constantemente emitidas pela coroa solar, e ao interagir com o CMT, causa a chuva magnética.

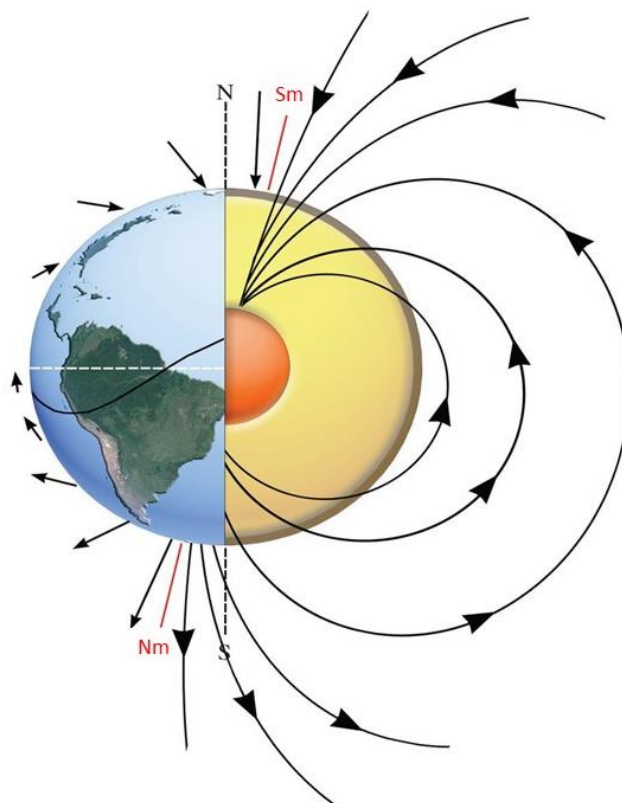


Figura 4. Representação ilustrativa do campo magnético terrestre. As linhas do campo magnético estão representadas (\rightarrow), juntamente com os polos geográficos Norte (N) e Sul (S), representados pela linha ---, e os polos magnéticos Norte (Nm) e Sul (Sm) pela linha vermelha.
Fonte: Adaptado de Shaw et al., 2015

Entre os seres vivos há diferentes estratégias de magnetorecepção. A indução eletromagnética, onde há a percepção da intensidade do campo, ou da polaridade, havendo atração ou repulsão por algum polo magnético, ou de ambos. A magnetorrecepção química, em que a sensibilidade ao CMT, induz a interação entre íons de radicais pareados, havendo distúrbios na dinâmica quando na presença do CM, resultando alterações fisiológicas em seres vivos (80). Por fim, a presença de estruturas especializadas contendo magnetita (Fe_3O_4) ou greigite (Fe_3S_4), geralmente encontradas em estruturas celulares (81,82). A informação que o animal consegue interpretar pelo campo magnético define sua estratégia de orientação magnética podendo haver três tipos (83). A utilização do CMT horizontal como uma bússola de polaridade permite que o animal se oriente pela identificação dos polos Norte e Sul, sendo uma estratégia utilizada para pequenos deslocamentos. Outra forma de interpretar o CMT é por meio da inclinação do campo, sendo assim uma bússola de inclinação, onde o

animal consegue distinguir a região dos polos e do equador, de forma a ser utilizada para deslocamentos em grandes distâncias. Esta estratégia é dependente de específicos comprimentos de onda. A última estratégia é o mapa magnético, em que o animal consegue associar os pontos do CMT juntamente com os da superfície terrestre, assim conseguem se deslocar para locais em que nunca estiveram antes, e também para longas distâncias (84).

As bactérias magnetotáxicas, do inglês *magnetotactic bacteria* (MTB) possuem magnetossomos, os quais são organelas compostas por magnetita ou greigite, de acordo com a profundidade e disponibilidade de oxigênio do ambiente. Em ciliados e flagelados, que se alimentam de MTBs, há a biomineralização dos magnetossomos dentro dos vacúolos, tornando-se magneto sensíveis (85,86). Alguns dinoflagelados, além da biomineralização, realizam ectosimbiose com MTB's (87). A funcionalidade do consumo de magnetita ou da ectosimbiose é a magnetotaxia quando em ambientes anóxicos, com pouca luminosidade e condições extremas (88). Em algas, também encontra-se cristais de magnetita no interior das células (Araujo et al., 1986).

O molusco *Tritonia diomedea* utiliza o CMT para se locomover em ambientes escuros e profundos, sendo os neurônios responsáveis pela atividade motora estimulados pelo CM (90,91). Nos anfíbios, como por exemplo as salamandras, a magnetorrecepção química associada a outras estruturas sensoriais, permite o animal de se localizar e navegar em longas distâncias, porém sendo dependente de luz devido os receptores estarem presentes nos olhos (92,93).

Abelhas, vespas, cupins e formigas, também possuem organelas de magnetita presente nas segmentações das antenas, sendo sensíveis a pequenas alterações do CMT. Utilizam da magnetorrecepção para se orientar e navegar em áreas ao redor do seu ninho ou em caminhos migratórios (94).

Os elasmobrânquios também conseguem perceber o CMT, porém ainda é desconhecido o receptor e até se utilizam para geolocalização, navegação ou ambos (95,96). O mesmo ocorre com répteis aquáticos, como crocodilos e tartarugas, onde desde a eclosão dos miracídios, os juvenis utilizam do mapa magnético, sendo fundamental para encontrar a praia de desova (97).

As aves migratórias contam como método de orientação e navegação a sensibilidade do CMT, retirando informações a partir da intensidade e ângulo geomagnético. Para isto, as aves têm magnetita no bico e na pele, bem como criptocromos presente nos olhos, tornando a magnetorecepção dependente de luz (98,99). Aves não migratórias, como os pombos, também utilizam o CM para se orientar quando há a troca da atividade noturna para a diurna.

Este trabalho abordará a importância do miracídio para a transmissão, visando estipular a sobrevivência e longevidade do miracídio de *S. mansoni*, estando estes em diferentes condições locais, além de prever um possível limiar de miracídios no qual a transmissão tenderá a extinguir-se espontaneamente. Também, será avaliada a capacidade do miracídio em responder a um campo magnético, descrevendo alterações em seu movimento.

2. JUSTIFICATIVA

Por ser uma parasitose classificada como problema de saúde pública mundial, a interrupção da esquistossomose é a meta proposta pela OMS, e um compromisso assumido pelos países participantes da WHA de 2012, incluindo o Brasil. Para o controle da transmissão muitas medidas são sugeridas, desde o tratamento coletivo de dose única para áreas com prevalência superior à 75%, como também a utilização de moluscidas para reduzir a população de hospedeiros intermediários (14). Para a próxima década, a WHO mantém seus planos de ação para a esquistossomose, ressaltando o controle da população de caramujos, bem como o desenvolvimento de novos métodos e novas medidas de controle do hospedeiro intermediário (15). O melhoramento de métodos de diagnósticos se tornou uma necessidade, visto que em áreas de baixa carga parasitária, a confirmação por diagnóstico é dificultada devido ao baixo número de ovos por grama de fezes, aumentando o número de resultados falso-negativos.

Nestas áreas em que a endemicidade é baixa, a transmissão da esquistossomose se torna vulnerável, visto que para haver sucesso na infecção dos hospedeiros, as formas larvais infectantes têm que passar por diversos obstáculos ambientais e biológicos. Assim, a probabilidade de infecção de moluscos reduz, e conseqüentemente há uma diminuição na transmissão e prevalência da esquistossomose. Nestas condições, surge a possibilidade de uma interrupção espontânea do ciclo da esquistossomose, ao ser atingido um limiar de eliminação de ovos nas fezes, abaixo do qual extingue-se a transmissão. Considerando-se a existência deste limiar, é teoricamente possível estabelecer a sensibilidade mínima necessária dos métodos de diagnósticos, guiando o desenvolvimento dos métodos a serem criados ou melhorados, bem como demais medidas de controle a serem tomadas.

Para estabelecer este valor de limiar, pode-se utilizar de um conjunto de dados experimentais já descritos e de modelagens por algoritmos matemáticos. Portanto, por meio da modelagem baseada em agentes, pode-se avaliar dinâmica entre parasito-hospedeiro, juntamente com fatores ambientais influenciadores, simulando diferentes situações na dinâmica entre as variáveis,

a fim de prever o comportamento desta relação em um longo tempo. Isto posto, se vê necessário a compreensão da relação entre o miracídio e as *Biomphalarias*, juntamente em relação aos fatores extrínsecos aos quais são expostos.

Contudo, o conhecimento atual sobre as características morfológicas e fisiológica dos miracídios são de grande maioria dos anos 1850 a 1999, sendo que alguns artigos não apresentam análise estatística, ou quando apresentam análises pouco exploratórias ou com testes de menor validade. Durante o século XXI poucos trabalhos apresentam enfoque no miracídio, havendo mais estudos sobre os atratores da *Biomphalaria*, assim focando-se a investigação na relação parasito-hospedeiro. O grande alvo de projetos de pesquisa se dá para as cercárias, visto que estas são a forma infectante, afetando diretamente os humanos, com certa negligência em estudos sobre os miracídios.

De muitos fatores externos que influenciam o comportamento do miracídio, o efeito do campo magnético nunca foi averiguado nas formas larvais, apenas em ovos. Nas cascas de ovos de *S. mansoni* se observaram características paramagnéticas quando submetidos a um campo magnético remanescente, possivelmente ocasionadas pela presença de ferro no sangue ingerido pelos animais quando no hospedeiro definitivo. Uma hipótese levantada para explicar o comportamento magnético do ovo, seria a presença da magnetita (100). O ferro é distribuído na casca do ovo, estando presente na espessura da casca (101).

A necessidade de medidas de intervenção na transmissão da esquistossomose se torna evidente, principalmente para áreas de alta endemicidade, já havendo diferentes abordagens de metodologias de intervenções e o surgimento de novos métodos de diagnósticos. Portanto, se faz preciso o conhecimento específico sobre as larvas infectantes, e sua dinâmica com seus hospedeiros e o ambiente em que vivem, sendo o foco deste trabalho a larva miracídio.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Estudar aspectos da dinâmica de interação e transmissão da esquistossomose mansônica entre o hospedeiro vertebrado e invertebrado, visando a importância do miracídio de *S. mansoni*.

3.2. Objetivos Específicos

- a. Descrever a sobrevivência dos miracídios de *S. mansoni*;
- b. Descrever a movimentação dos miracídios de *S. mansoni*, caracterizando fatores que influenciam neste comportamento;
- c. Investigar a capacidade do miracídios de *S. mansoni* em detectar e responder a um campo magnético;
- d. Desenvolver o modelo computacional baseado em agentes para avaliar a dinâmica de interação entre os miracídios e os caramujos;
- e. Verificar a hipótese da existência de um limiar de intensidade de infecção, especificamente quanto ao número de miracídios liberados na água, abaixo do qual a transmissão se extinguirá espontaneamente.

4. METODOLOGIA

4.1. Obtenção de Miracídeos

O ciclo de *Schistosoma mansoni* de linhagem LE é mantido em laboratório via infecção de camundongos Swiss e de *B. glabrata*. Portanto, camundongos infectados há cerca de 42 dias, são eutanasiados, para a obtenção dos fígados contendo ovos. A eclosão dos miracídios ocorre após maceração do fígado, e exposição à luminosidade incandescente e temperatura de aproximadamente 25°C. Após 30 minutos, a luminosidade é bloqueada e permitida apenas no cânulo da parte superior da garrafa. Em 5 minutos as larvas são coletadas.

Todos os animais utilizados para este projeto se enquadram no registro do comitê de Ética (CEUA 15/00443) do projeto “Manutenção do ciclo e produção de antígenos diagnósticos dos helmintos: *Schistosoma mansoni*, *Angiostrongylus cantonensis* e *A. costaricensis*”.

4.2. Movimentação Através do Tempo

Inicialmente observou-se os padrões de movimentação dos miracídios para estabelecer as categorias de avaliação da motilidade ao longo do tempo, baseando-se em características de velocidade, atividade ciliar, formato do corpo e coloração do indivíduo (Tabela 3). Consideraram-se mortos os miracídios que não apresentavam quaisquer movimentações, enquadrados na movimentação parada sem atividade ciliar.

Tabela 3. Categorias estabelecidas pré observações de movimentação do miracídio de *S. mansoni*.

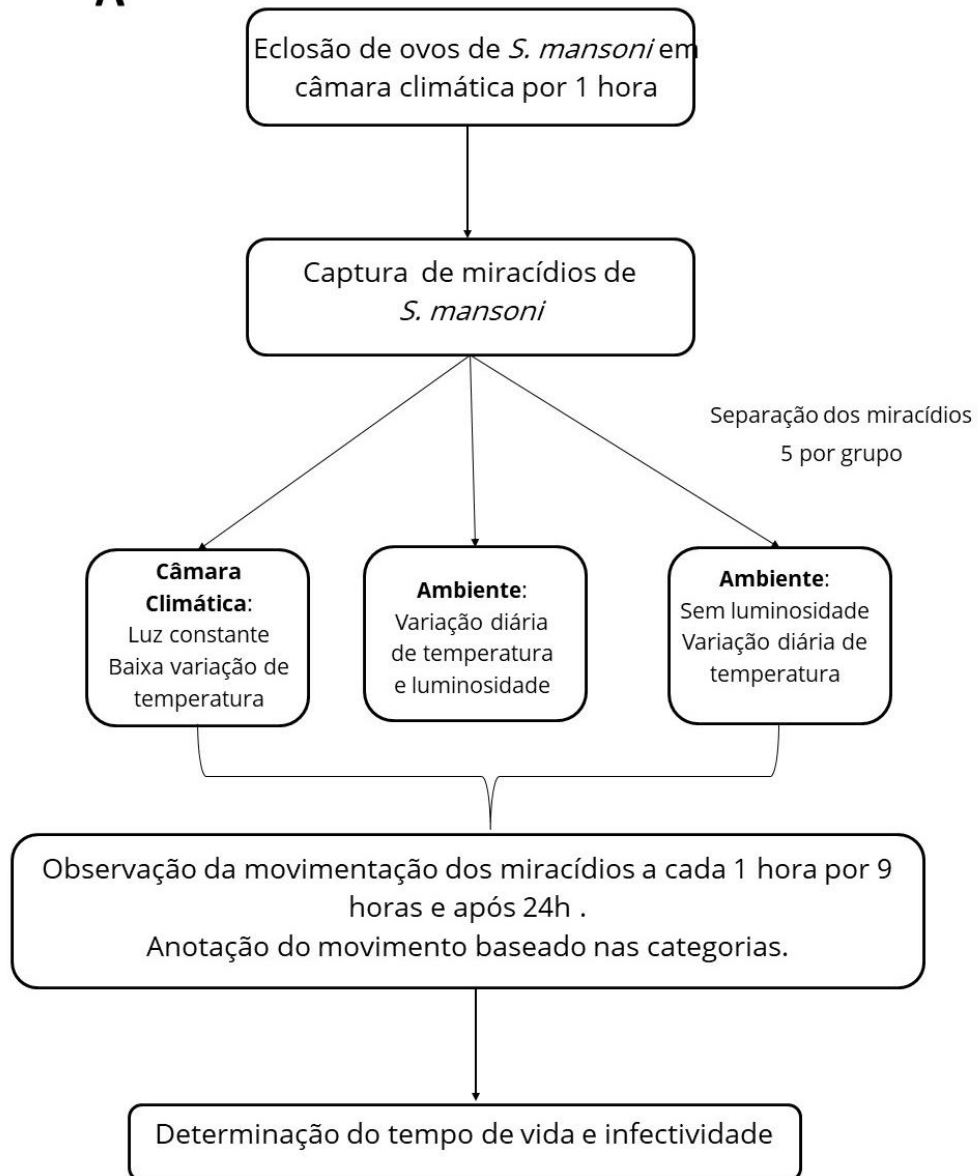
<i>Movimentações</i>	<i>Movimentação Ativa</i>	<i>Velocidade</i>	<i>Formato do corpo</i>	<i>Coloração</i>
<i>Máxima</i>	Sim	Rápida	Estirado	Branco translúcido
<i>Rápida</i>	Sim	Rápida	Estirado com bordas arredondadas	Branco translúcido
<i>Lento</i>	Sim	Devagar	Arredondado	Branco translúcido
<i>Muito lento</i>	Sim	Lenta	Oval	Branco translúcido
<i>Parado</i>	Apenas Cílios	Nenhuma	Oval	Branco translúcido
<i>Parado</i>	Não	Nenhuma	Oval	Branco sólido

Em uma placa de poços côncavos de 12.5 mm de diâmetro, 5 miracídios com uma hora de vida foram postos em aproximadamente 300 μ L de água, com pH entre 7,5 a 8,6. Após observou-se a movimentação de cada indivíduo, registrando a luminosidade e temperatura. A visualização dos poços se deu por meio de um microscópio estereoscópico em magnificação de 10x. Para avaliar a variação do movimento foram realizadas duas etapas de experimentos.

A primeira etapa consiste na visualização dos miracídios a cada hora de vida durante 9 horas e após 24 horas (Figura 5-A). Os miracídios foram divididos em três grupos, sendo: os que ficaram em ambiente de temperatura e luminosidade controlada, os de ambiente claro, e os de ambiente escuro. Desta forma, cada experimento foi composto por três replicatas, sendo feito 10 repetições.

Na segunda etapa, as placas contendo os miracídios foram submetidas a quatro ambientes diferentes, sendo estes em ambiente com luminosidade e temperatura ambiente, em temperatura ambiente sem luminosidade, temperatura e luminosidade controlada e constante, e temperatura controlada e constante sem luminosidade (Figura 5-B). O tempo de observação foi aumentado para 10 horas, visto que na primeira observação houve miracídios que sobreviveram além das 9 horas. O intervalo entre as observações foi reduzido para cada meia hora de vida dos miracídios, mantendo o registro do tipo de movimentação. Cada experimento foi repetido dez vezes com duas replicatas cada.

A água destilada utilizada apresentava concentração de elementos químicos mesmo após o processo de destilação, sendo previamente testada a eclosão e seu efeito no miracídio para descarte de influência, de forma que não houve alteração nos parâmetros avaliados em relação à água destilada. Em ambas as observações, as temperaturas diárias variaram de acordo com o horário observado e o clima do dia em que o experimento foi realizado, de forma que as temperaturas variaram de 15°C a 28°C. E a luminosidade diária variou de 1 x10luz a 280 x10 luz.

A

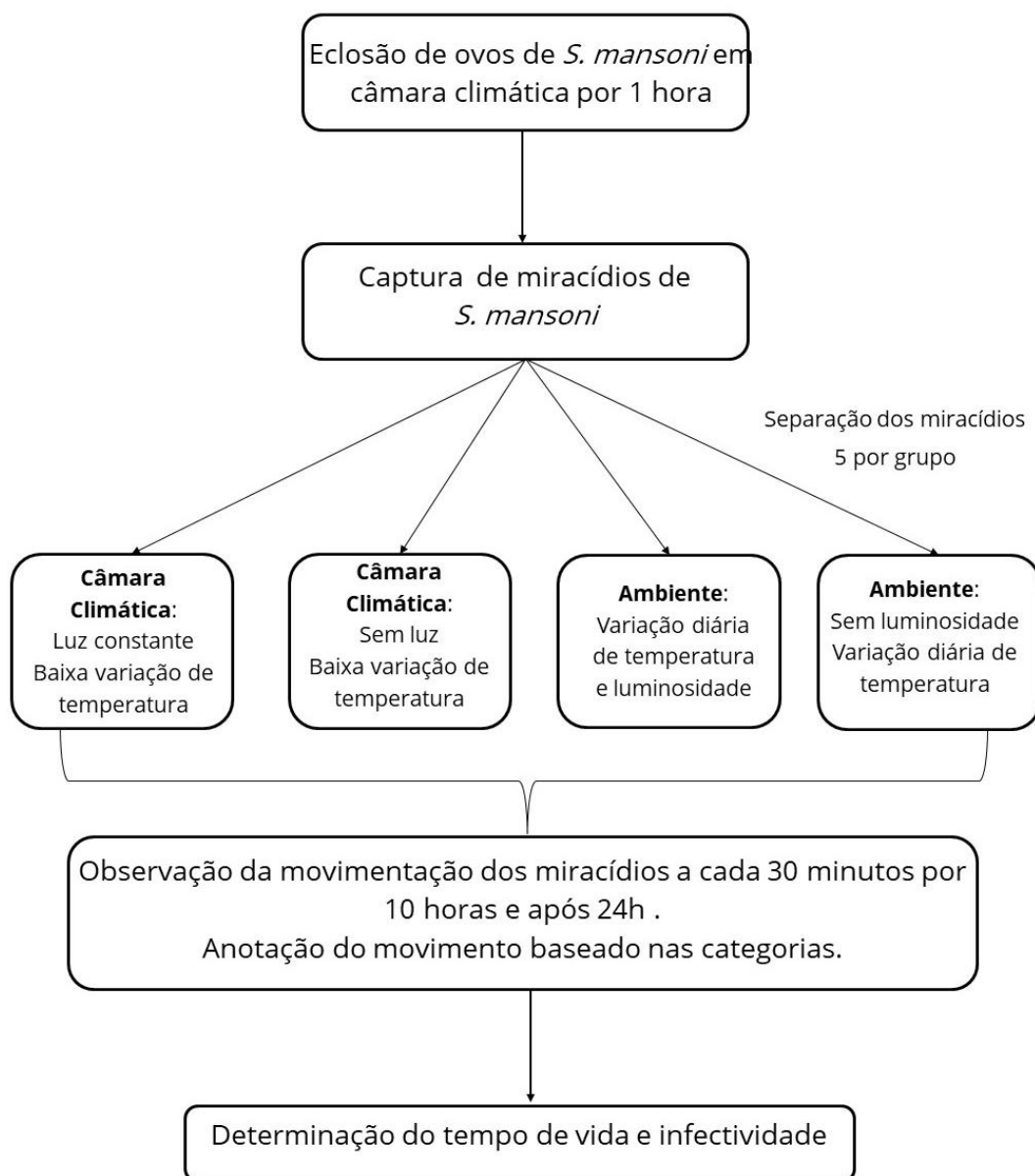
B

Figura 5. Representação esquemática do monitoramento da movimentação dos miracídeos de *S. mansoni*. A. Primeira observação, a cada uma hora em 3 diferentes ambientes. B. Observação a cada meia hora em 4 diferentes ambientes

4.3. Infectividade

Com objetivo de determinar a infectividade baseada na movimentação dos miracídeos ao longo do tempo, considerou-se os dados obtidos pelo item 4.2, onde miracídeos como movimentação 1, 2 e 3 foram considerados infectantes, enquanto os demais movimentos formam definidos como

incapacidade de infectar. Portanto, considerou o tempo total de infectividade por indivíduo, até começarem a apresentar movimentação extremamente lenta.

4.4. Influência do Campo Magnético no movimento de Miracídios

Com o intuito de avaliar a influência de um campo magnético no comportamento do miracídio, foi utilizada a Bobina de Helmholtz, a qual é composta por dois aros circulares de fio de cobre, que quando em circuito fechado conduzem uma corrente, gerando um campo magnético local e constante (Figura 6A).

Portanto, 50 miracídios com no máximo 3 horas de vida foram colocados em uma gota de aproximadamente 250 μ l de água destilada. Estes foram dispostos no centro da bobina de Helmholtz, que operou com uma corrente de aproximadamente 1 Ampère e voltagem de 2,5 Volts. Foram feitas dez filmagens, em que para cada experimento foi filmado por 15 minutos, onde os primeiros 5 minutos a bobina estava desligada, nos 5 minutos subsequentes a bobina foi ligada, e no restante do tempo a bobina foi desligada novamente (Figura 6B).

Após a realização do experimento, foi observado o número de miracídios que não apresentavam movimentação, estando apenas mexendo os cílios, porém sem conseguir nadar, ou os que estavam mortos. Também, foi registrado intensidade luminosa incidente na gota, temperatura da sala e da água, com finalidade de exclusão dos efeitos externos na mobilidade dos miracídios durante análise.

Pelo programa ImageJ de 64-bit com Java 1.8.0_172, retirou-se a luminosidade mínima dos vídeos, e foi ajustado o *threshold* dos *frames* juntamente com o fundo. Devido à baixa qualidade de resolução dos *frames*, não foi possível fazer o rastreamento automático pelos *plugins* wrMTrck e wrMTrck2, portanto pelo *plugin* MTrackJ fez-se o rastreamento manual, onde fez-se um ponto para a localização do miracídio no *frame* observado (Figura 7). O tamanho extensivo do vídeo também foi um limitante das análises, sendo superior a 9000 frames por vídeo, e por isso optou-se por reduzir o tamanho para menos de 1 minuto por vídeo tendo cerca de 1800 frames. O tempo analisado foi a partir de 3 min de gravação até completar 4 min,

evitando utilizar o tempo inicial onde os animais poderiam estar aclimatando-se.

Os trajetos de cada miracídio foram inseridos no software Origin Microcal versão 6.0, onde calculou-se a distância percorrida, o tempo, a média, o desvio e erro padrão, os valores preditos para cada eixo de cada trajetória e a frequência de rotação em relação ao eixo X das coordenadas para cada indivíduo. Em seguida, calculou-se a velocidade média e velocidade tangencial de cada miracídio rastreado. A partir destes parâmetros avaliou-se se houve diferença significativa no deslocamento dos animais, na velocidade média, na frequência de rotação e no raio percorrido.



Figura 6. **A** Foto da bobina de Helmholtz, conectada à fonte, e com adaptação de uma lupa estereoscópica, sendo posicionado na mesa da lupa a placa de poços côncavos, e ao lado uma bússola. **B.** Tempo de filmagem de acordo com a exposição ao campo magnético, sendo avaliado um minuto de cada filmagem pelo programa ImageJ.

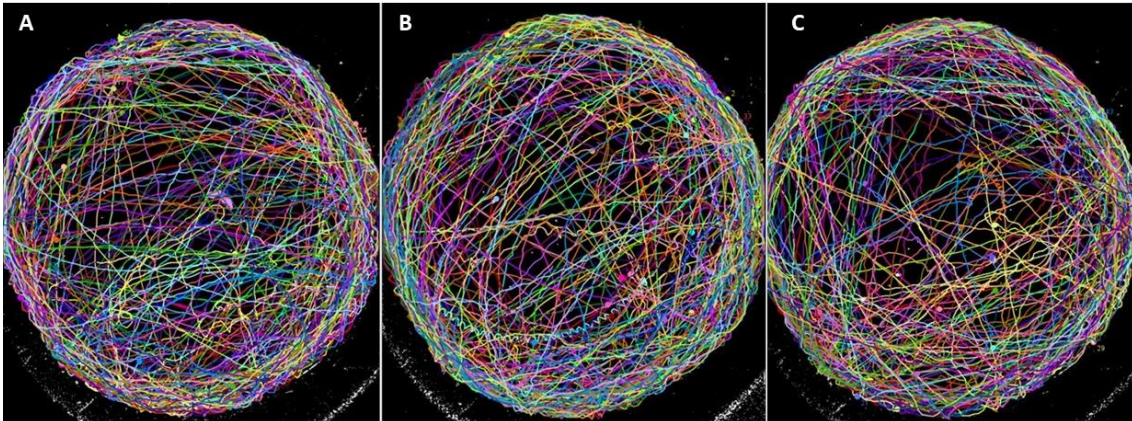


Figura 7. Trajetos dos miracídeos de *S. mansoni* quando (A) bobina desligada, (B) bobina ligada e (C) bobina desligada. Cada cor de linha representa o trajeto individual de um miracídio ao longo do monitoramento.

4.5. Modelagem Baseada em Agentes

Inicialmente se fez uma revisão na literatura para definir os fatores intrínsecos e extrínsecos que modulam a interação entre o miracídio e seu hospedeiro. Desta forma, o modelo aqui apresentado refere-se a interação entre o miracídio de *S. mansoni* e a *B. glabrata*.

Para explorar como ocorre a interação entre o miracídio e os caramujos no ambiente, bem como explorar a existência do limiar de transmissão da esquistossomose, realizou-se uma modelagem baseada em agentes (ABM) por meio do programa Netlogo versão 6.1.1 (Anexo 1) (Figura 8). Inicialmente estabeleceu-se como vetores as *Biomphalaria* e os miracídeos, ao qual definiu-se no programa suas principais características individuais tentando manter a escala de tamanho. A respeito dos miracídeos, atribui-se valores de tamanho populacional, energia inicial e capacidade de infectar. Das *Biomphalaria* considerou-se o tamanho populacional e a reprodução dos indivíduos, a secreção do muco atuando como atraente, e sua diluição no meio. Os fatores externos como temperatura, luminosidade e viscosidade foram considerados, os quais definiu-se que dependendo da situação ambiental a energia do miracídio pode ser favorecida ou lesionada, como por exemplo quando em temperatura inferior a 20°C e viscosidade alta, a cada tempo (*tick*) a energia do miracídio era reduzida em 3%, enquanto em

temperaturas superiores a 21°C e baixa viscosidade, reduzia-se 2% da energia do miracídio (Figura 9).

A infecção das *Biomphalaria* foi determinada pela proximidade de ambos os agentes, sendo influenciada pela energia do miracídio, relação de temperatura e viscosidade. Quando infectado, o interior do caramujo se altera da cor branca para vermelha, sendo posteriormente contabilizado o número de indivíduos vermelhos para a determinação de caramujos infectados. O miracídio que infectou o caramujo é definido como morto pelo código, para que o mesmo miracídio não infecte mais de uma *Biomphalaria*. A cada corrida da simulação foi realizada a plotagem da relação de número de *Biomphalaria* infectadas em relação a população total, duração da energia de miracídios em relação ao tempo, e o tempo de vida dos miracídios.

Para explorar a infecção de *Biomphalaria* de acordo com o tamanho populacional de ambos os agentes, inicialmente determinou-se condições ambientais consideradas ideais para o sucesso de infecção, sendo temperatura de 25°C, luminosidade de 2500 luz e viscosidade de 20. O tamanho populacional comparado Para cada valor das variáveis, repetiu-se a modelagem em 2000 vezes, sendo os resultados salvos em arquivo "txt" (Anexo 2)

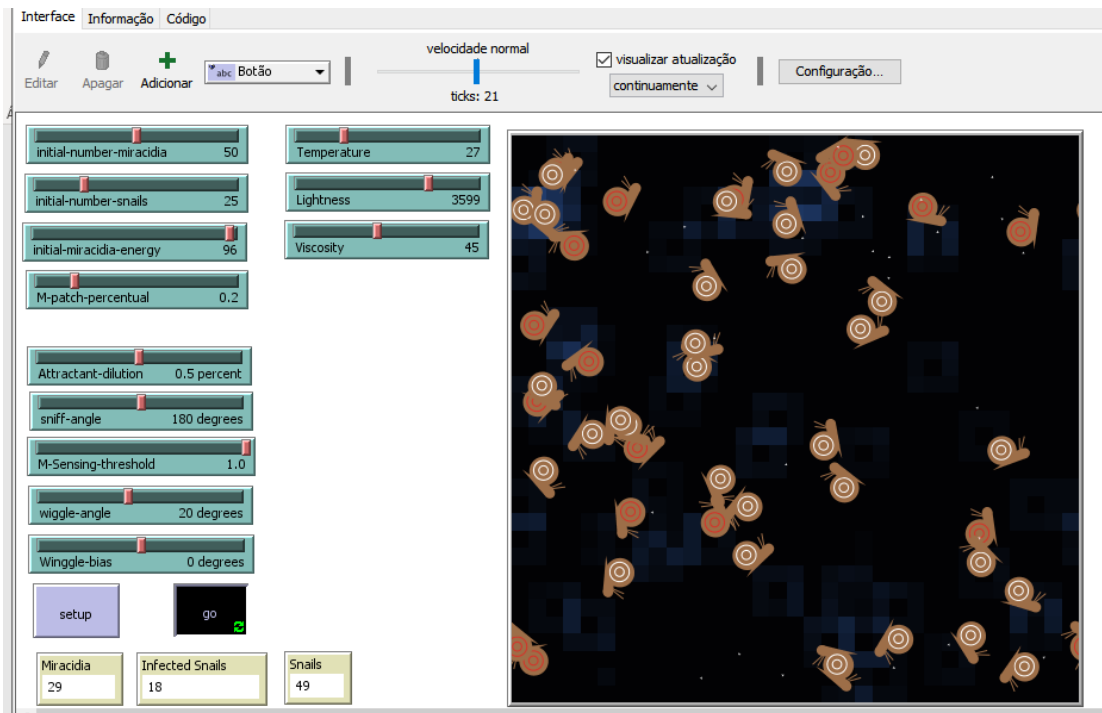


Figura 8. Interface do modelo em NetLogo. Na interface que representa o “ambiente”, há a representação dos caramujos em marrom (caramujos infectados representados pelo interior vermelho, e os caramujos não infectados pelo interior branco). Os miracídios são representados por forma circular branca. Em azul o muco diluído do caramujo. Nos sliders são os valores dos parâmetros ambientais (temperatura, luminosidade e viscosidade), parâmetros dos agentes: 1) caramujos (número inicial da população, diluição do atraiente); 2) miracídios (número inicial da população, energia inicial, percentual de caminho, angulação do movimento, sensoriamento do atraiente).

```

to go
  if not any? miracidia [ stop ] ;; stops the running when all the M agents have died
  ask miracidia [ ;; miracidia procedure to randomly swim
    move-turtles

    if temperature < 21 and viscosity > 50 [set miracidia-energy miracidia-energy - 3]
    if temperature < 21 and viscosity < 50 [set miracidia-energy miracidia-energy - 4]
    if temperature > 21 and viscosity < 50 [set miracidia-energy miracidia-energy - 1]
    if temperature > 21 and viscosity > 50 [set miracidia-energy miracidia-energy - 2]
    if temperature > 30 and viscosity < 50 [set miracidia-energy miracidia-energy - 3]

    if lightness > 2000 [set miracidia-energy miracidia-energy - 2]
    if lightness < 2000 [set miracidia-energy miracidia-energy - 1]
    if lightness < 1000 [set miracidia-energy miracidia-energy - 3]

    if temperature > 10 [
      infect-snails]

    check-death
  ]
  ask snails [ ;; snails procedure to randomly swim
    move-turtles
  ]

  ask miracidia [
    if attractant > M-sensing-threshold
    [ turn-toward-attractant ]
    rt random-float wiggle-angle - random-float wiggle-angle + winggle-bias
    fd 2
  ]
]

```

Figura 9. Ilustração de parte do código na linguagem NetLogo (Anexo 1). A função "to go" invoca os comandos a cada corrida do código. O "if" implica em uma condição, onde o resultado é determinado pelo []. A função "ask" relaciona a condição ao agente "miracidia". O comando "stop" determina o encerramento da corrida.

4.6. Análise Estatística

Os dados obtidos para motilidade dos miracídios ao longo do tempo, pelo teste de Shapiro-Wilk apresentaram anormalidade ($p < 0,05$), assim para saber se houve diferença na sobrevivência dos grupos, realizou-se a análise de sobrevivência de Kaplan-Meier, excluindo eventos que ocorrem em dias com clima tempestuoso, e eventos que ocorreram em tempo maior que as observações. As diferenças detectadas foram confirmadas pelo teste de Wilcoxon não pareado, onde considerou-se diferença quando $p < 0,05$.

Devido os valores de tempo de infectividade dos miracídios apresentarem anormalidade pelo teste de Shapiro-Wilk ($p < 0,05$), realizou-se o teste de Wilcoxon para avaliar diferenças entre os grupos. Os testes para estes experimentos foram realizados utilizando o programa Rstudio versão 4.0.3, e o programa SPSS.

Para a análise das modelagens realizadas, no Rstudio versão 4.0.3, fez-se uma regressão linear múltipla, na qual considerou significativo o efeito de variáveis quando $p > 0.05$. A relação causa-efeito foi avaliada sobre a média final de caramujos infectados, para cada valor no final das 2000 corridas. A fim de confirmar a independência das variáveis populacionais, performou-se o teste de correlação de Pearson.

O efeito do campo magnético sobre o comportamento do miracídio, inicialmente foi verificado por um teste de ANOVA one-way, para os valores de frequência de rotação, de raio percorrido e velocidade média dos indivíduos, no software Origin versão 6.0. Dos que apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$), realizou-se o teste Dunn para comparação para amostras não pareadas no programa GraphPad Instant. E para confirmação de efeito realizou-se o teste binominal pela plataforma digital <http://www.quantitativeskills.com/>.

5. RESULTADOS

5.1. Movimentação Através do Tempo

Nos miracídios que foram observados a cada hora, pelo teste de Kaplan-Meier, obtiveram a sobrevivência geral de 5,83 ($\pm 0,130$) horas (Tabela 4). Entre os grupos houve diferença na sobrevivência dos miracídios que permaneceram em ambiente controlado em relação aos outros ambientes ($p < 0,05$). A média de sobrevivência foi de 7,831 ($\pm 0,235$) para os miracídios que ficaram na câmara climática, enquanto os que permaneceram em ambiente e ambiente escuro sobreviveram respectivamente 5,48 ($\pm 0,214$) e 5,38 ($\pm 0,224$) horas (Figura 8). Quando em 7h de vida atingiu-se 53,6% de mortes, em que 1,8% dos miracídios conseguiram manter velocidade máxima até 8h, e 5,3% mantiveram velocidade rápida até as 9h (Figura 10).

Tabela 4. Média de longevidade, em horas, dos miracídios de *S. mansoni* observados a cada uma hora e separados em três: Ambiente, Ambiente Escuro, Câmara Climática) e todos juntos.

Grupo	Média e Medianas de Tempo de Sobrevivência (horas)							
	Média				Mediana			
	Estimado	Erro Padrão	95% Intervalo de Confiança		Estimado	Erro Padrão	95% Intervalo de Confiança	
			Limite Inferior	Limite Superior			Limite Inferior	Limite Superior
Ambiente	5,380	,224	4,940	5,820	5,000	,495	4,030	5,970
Ambiente Escuro	5,487	,214	5,068	5,906	5,000	,408	4,200	5,800
Câmara Climática	7,831	,220	7,385	8,249	8,000	-	-	-
Todos	5,831	,142	5,552	6,109	6,000	,315	5,380	6,620

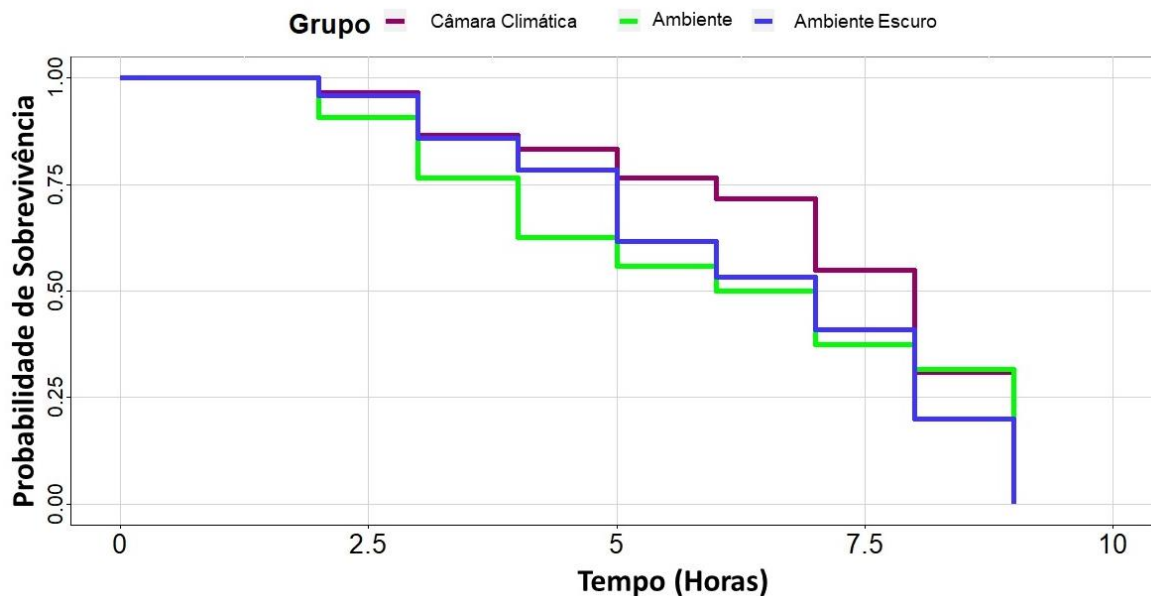


Figura 10. Gráfico de probabilidade de sobrevivência dos miracídios de *S. mansoni* ao longo do tempo (horas) nos diferentes grupos. Câmara climática (bordô), ambiente (verde) e ambiente escuro (azul).

Na segunda observação, feita a cada meia hora, a mediana do tempo de vida dos miracídios foi de 3h30 ($\pm 0,45$) (Tabela 5). Pelo teste de Wilcoxon, os grupos não apresentaram diferença entre as medianas, exceto entre os que ficaram em câmara escura e os de ambiente escuro ($p = 0,03$). Pela análise de sobrevivência de Kaplan-Meier não houve diferença entre os grupos (Figura 10). Não foi possível inferir algum efeito do tipo de ambiente e luminosidade sobre o tempo de vida dos miracídios. A maioria dos miracídios obtiveram uma rápida queda de movimentação nas três primeiras horas de vida, onde após 3 horas e meia de vida, 52,5% dos miracídios já não apresentavam movimentação (Figura 11), A partir das 6 horas de vida, somente 8% dos miracídios estavam vivos. Menos de 1% dos miracídios permaneceu ativo depois das 9h, havendo apenas um indivíduo que permaneceu vivo após as 10h.

Tabela 5. Média de sobrevivência, em minutos, dos miracídios de *S. mansoni* monitorados a cada meia hora. Avaliou-se os grupos individualmente (Ambiente, Ambiente Escuro, Câmara Climática e Câmara Escura), e todos os indivíduos juntos.

Média e Medianas de Tempo de Sobrevivência (minutos)								
Grupo	Média				Mediana			
	Estimado	Erro Padrão	95% Intervalo de Confiança		Estimado	Erro Padrão	95% Intervalo de Confiança	
			Limite Inferior	Limite Superior			Limite Inferior	Limite Superior
Ambiente	216,600	8,524	199,894	233,306	210,000	10,452	189,515	230,485
Ambiente Escuro	225,000	9,539	206,303	243,697	210,000	10,498	189,424	230,576
Câmara Climática	219,000	9,200	200,968	237,032	180,000	11,102	158,240	201,760
Câmara Escura	202,800	9,087	184,990	220,610	180,000	8,566	163,211	196,789
Overall	215,850	4,548	206,935	224,765	180,000	5,600	169,023	190,977

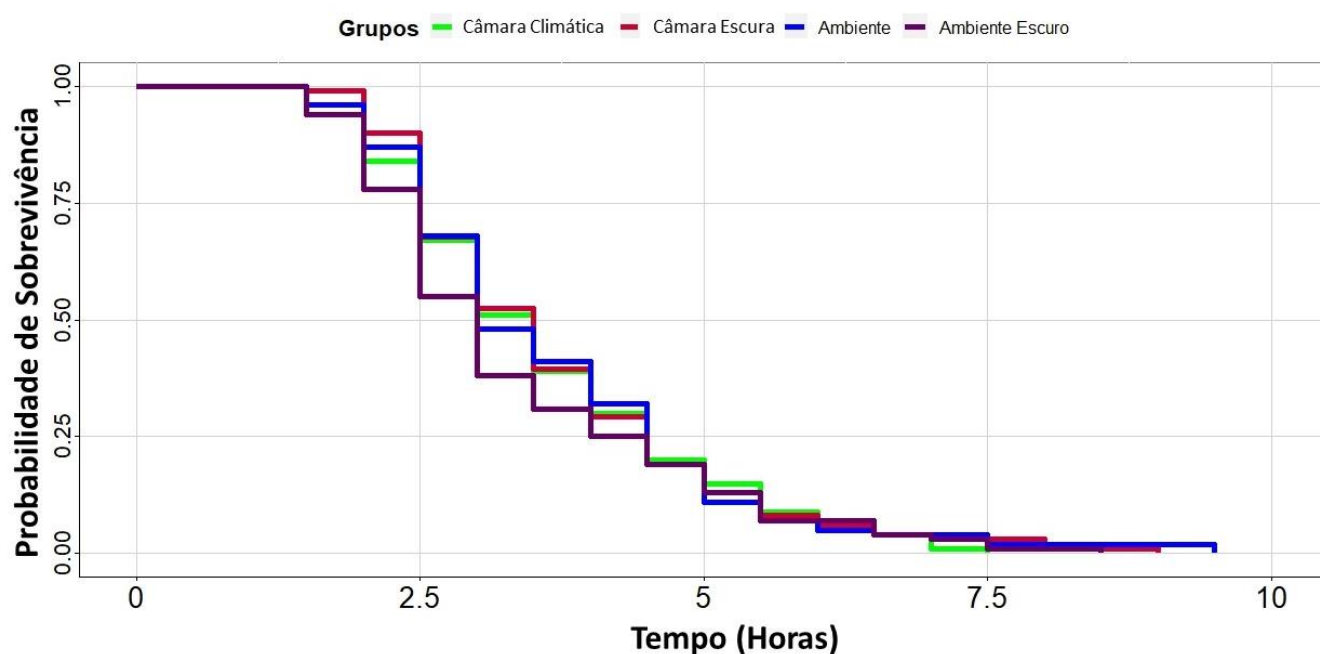


Figura 11. Probabilidade de sobrevivência dos miracídios de *S. mansoni*, em horas. Cada linha representa os seguintes grupos: Câmara Climática (verde), Câmara Escura (vermelho), Ambiente (azul) e Ambiente Escuro (roxo).

5.2. Infectividade

No primeiro grupo de observação, a infectividade média baseada na motilidade foi de 4,428 ($\pm 0,631$) horas quando considerando os grupos juntos

(Figura 12). Os que permaneceram em ambiente controlado apresentaram uma média de $4,567 (\pm 0,439)$ horas, e mediana de 5 horas de infectividade, enquanto os que ficaram em ambiente (4,293 \pm 0,586 horas) e em ambiente escuro (4,48 \pm 0,825 horas) apresentaram mediana de 4 horas. Desta forma, não houve diferença estatística significativa entre os grupos ($p > 0,05$). As movimentações consideradas infectantes foram superiores a 50% até 4h, sendo que até 9h apenas 7,1% se mantiveram infectantes (Figura 13).

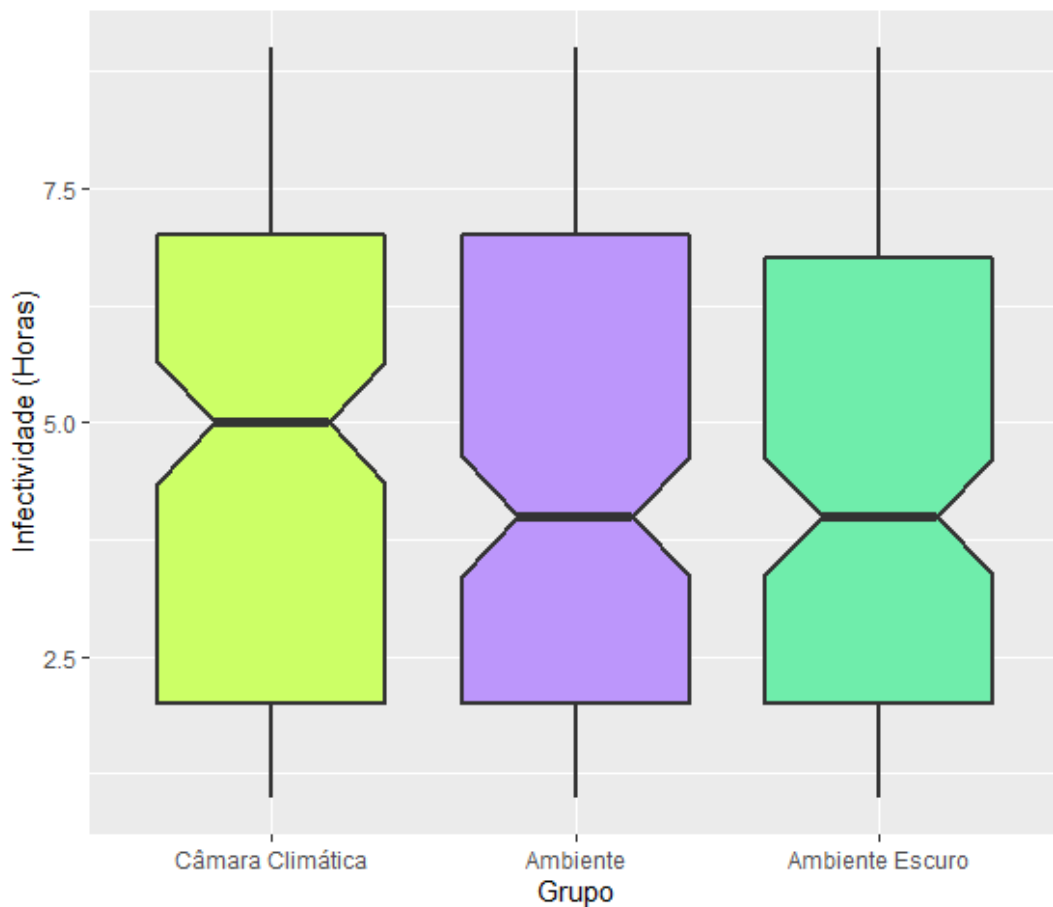


Figura 12. Boxplot da infectividade dos miracídios de *S. mansoni*, em horas, das observações a cada hora, dos diferentes grupos: Câmara Climática (verde), Ambiente (roxo) e Ambiente Escuro (azul). O afunilamento em cada box representa a mediana do grupo.

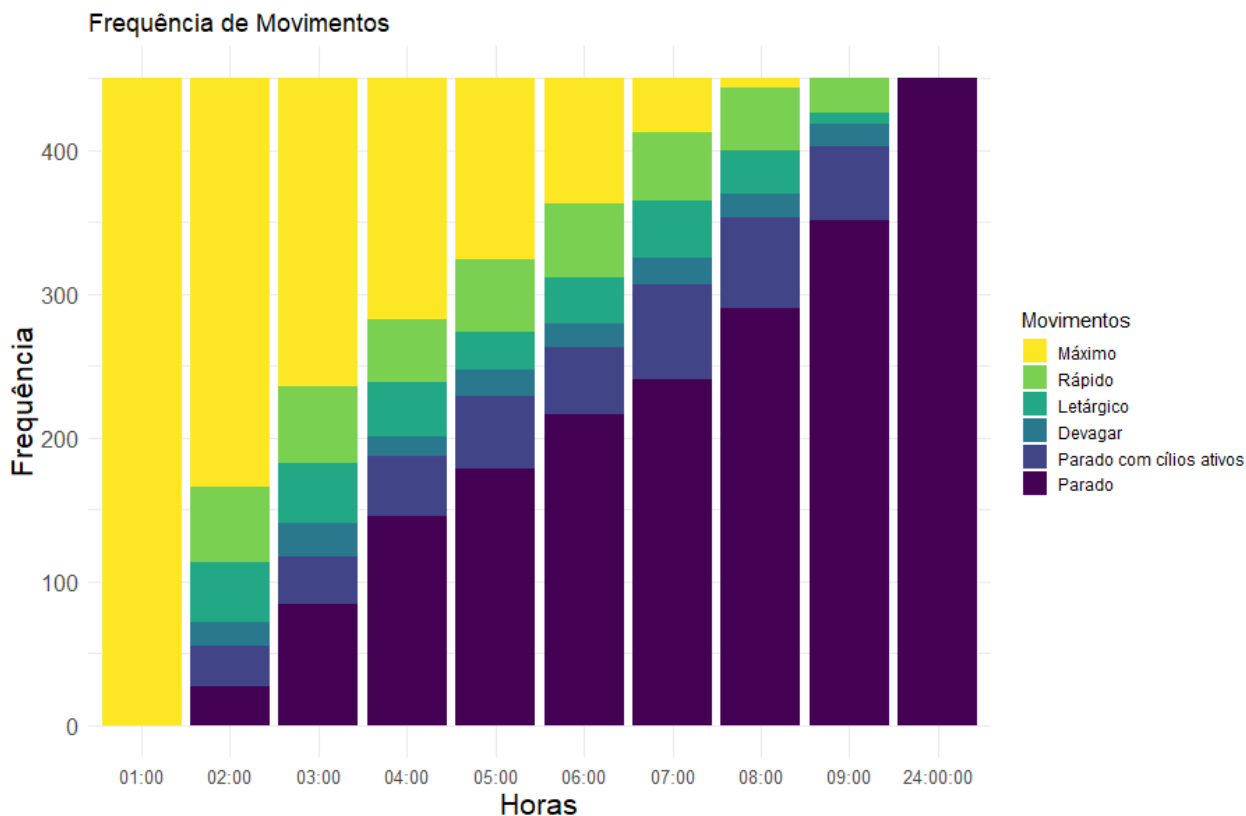


Figura 13. Frequência das categorias dos movimentos dos miracídeos de *S. mansoni* observados a cada uma hora durante 9 horas. As categorias de movimentação são: velocidade máxima (amarelo), rápido (verde), letárgico (azul), devagar (azul petróleo), parado com movimento ciliar (azul) e parado sem movimento ciliar (roxo).

Para os miracídeos que foram observados de 30 em 30 minutos, a infectividade mediana de todos miracídeos juntos foi de 2 horas. Observou-se apenas uma diferença estatística significativa entre os miracídeos de câmara escura e os de ambiente ($p=0,03$), os demais grupos não apresentaram diferenças quando comparados. Aqueles que permanecerem em locais com luz obtiveram uma infectividade mediana de 2h30, enquanto os que ficaram em ambientes sem luz, tiveram infectividade de 2 horas (Figura 14). A infectividade dos indivíduos se manteve acima dos 50% até 2h30, onde após teve um rápido decréscimo, resultando em apenas 14% infectantes com 4h, e infectividade menor que 10% nas horas seguintes (Figura 15). Às 9h de vida, somente 0,5% dos indivíduos apresentou movimentação considerada infectante, sendo as movimentações rápida e lenta. A partir de 9h30 de vida nenhum indivíduo foi considerado infectante.

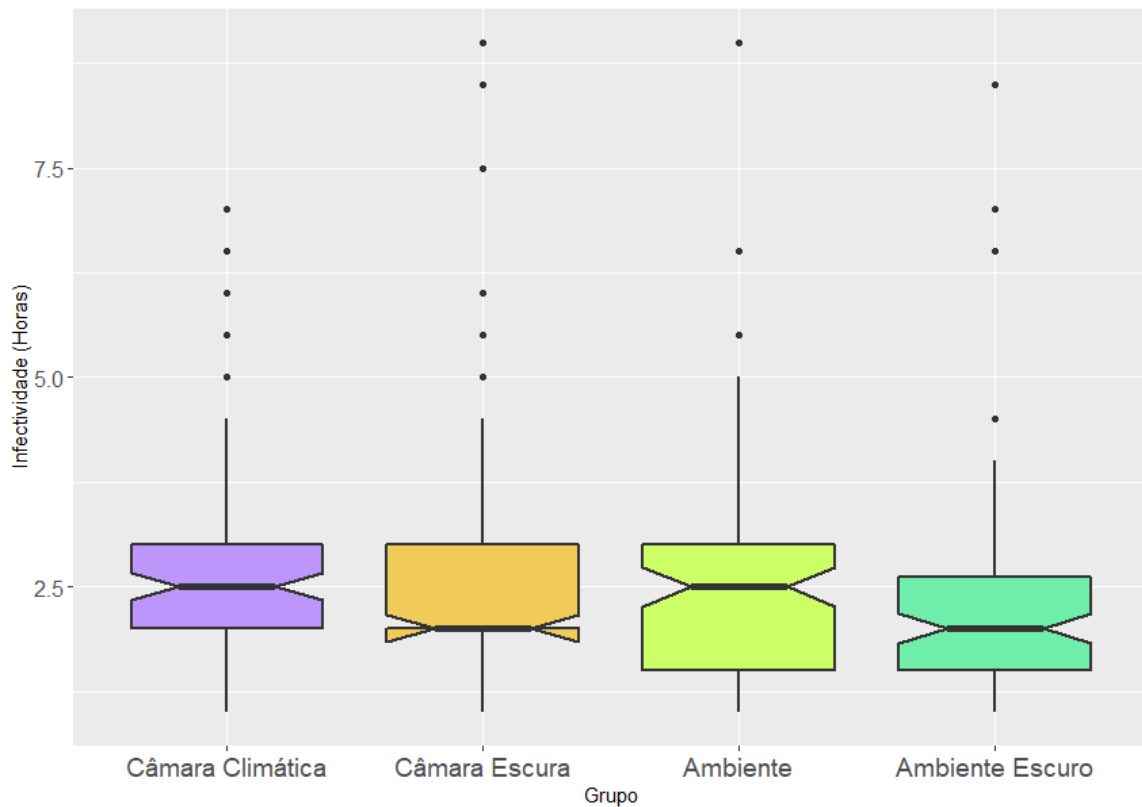


Figura 14. Boxplot da infectividade em horas dos miracídios de *S. mansoni* nos diferentes ambientes: câmara climática (lilás), câmara climática sem luz (laranja), ambiente (verde), ambiente escuro (azul claro).

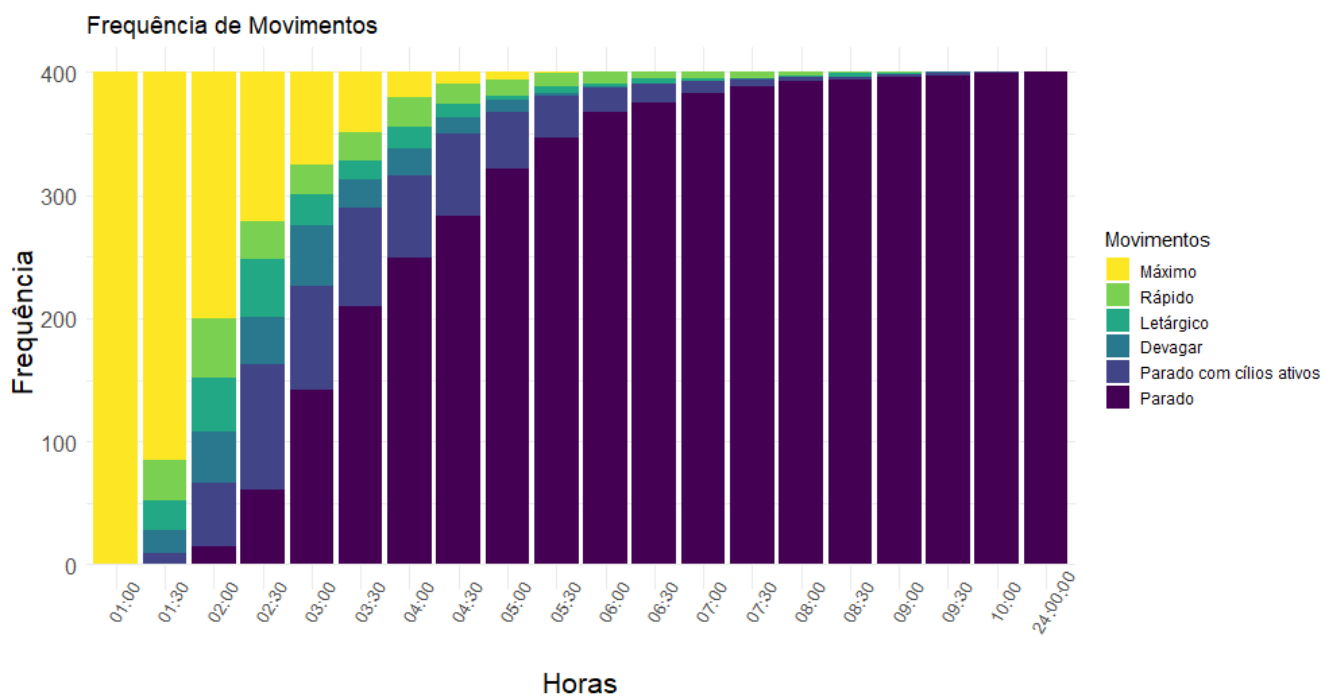


Figura 15. Frequência das categorias dos movimentos dos miracídios de *S. mansoni* observados a cada meia hora durante 10 horas. As categorias de movimentação são: velocidade máxima (amarelo), rápido (verde), letárgico (azul), devagar (azul petróleo), parado com movimento ciliar (azul) e parado sem movimento ciliar (roxo).

5.3. Modelagem Baseada em Agentes

Para a modelagem envolvendo os valores de populações dos vetores, tanto o tamanho populacional tanto do caramujo (PopS) quanto do miracídio (PopM), ambos apresentaram efeito significativo ($p < 2,2e-16$), onde o aumento do número de caramujos infectados foi proporcional ao crescimento das populações. Quando analisado o efeito dos tamanhos populacionais juntos também apresentou significância, com $p < 2,2e-16$.

Das simulações, apenas em quatro modelagens não houve nenhuma infecção em quaisquer das 2000 corridas, sendo isto quando: PopS = 15 e PopM = 5, PopS = 5 e PopM = 10, PopS = 10 e PopM = 5, PopS e PopM = 5. Houve 33 combinações de valores de PopS e PopM em que a média de infecções foi abaixo de um caramujo infectado, onde nestes casos ambas as populações começavam com um baixo número ou havia uma grande diferença entre o tamanho populacional de um agente, quando comparado com o outro, como no caso em que PopS = 5 e PopM = 100, e a média de infecção de 0.55 caramujo. A média de infecção aumentou de acordo com o aumento de PopM e PopS, mas principalmente quando houve aumento em PopM. Em nenhum conjunto de simulações houve uma média de infecção de 100%, sendo o máximo de 80,96 caramujos. A influência das populações sobre a quantidade de simulações em que não houve infecção foi significativa ao comparar o efeito de PopM e PopS juntos ($p = 1,46e-09$) e separadamente, respectivamente $p < 2,2e-16$ e $p = 2,59e-15$.

5.4. Influência do campo magnético no movimento dos miracídios

Das trajetórias retiradas do ImageJ, não houve nenhuma diferença no deslocamento dos indivíduos e no raio percorrido. No entanto, observou-se uma diferença estatística para os valores de velocidade média e de frequência de rotação ($p < 0,05$) em oito vídeos dos dez analisados (Tabela 6). Este efeito do campo, pelo teste binomial, apresentou significância estatística, com $p = 0,033$.

Em dois vídeos os miracídios apresentaram diferença estatística para a velocidade média e para a frequência de rotação, enquanto dois vídeos apresentaram diferença na velocidade média e seis apenas na frequência de rotação. O efeito da bobina ligada foi observado em apenas, três vídeos, sendo dois observados na velocidade média e um na frequência, não apresentando significância estatística ($p=0,746$). Na maioria, observou-se uma diferença estatística significativa após a exposição ao campo magnético.

Tabela 6. Valores de p para os parâmetros de Velocidade, Frequência de rotação e raio para cada vídeo, e os valores de p de acordo com o teste de Dunn comparando pré exposição e pós exposição à bobina (D1-D2), pré exposição e com bobina ligada (D1-L) e pós exposição e bobina ligada (D2-L) para os valores de frequência de rotação e de velocidade média que foram diferentes significativamente.

Vídeo	pVelMed	pFcx	rCx	Dunn Test Fcrx			Dunn Test VelMed		
				D1-D2	D1-L	D2-L	D1-D2	D1-L	D2-L
1	0,59988	2,11E-05	0,19069	P<0,001	P>0,05	P<0,001	-	-	-
2	0,52039	0,52055	0,35305	-	-	-	-	-	-
3	3,03E-04	1,01E-10	0,09053	P<0,001	P>0,05	P<0,001	P<0,05	P>0,05	P<0,001
4	0,55607	0,02721	0,24801	P<0,001	P<0,001	P>0,05	-	-	-
5	0,0372	0,13262	0,18753	-	-	-	P<0,05	P>0,05	P>0,05
6	0,00568	0,28261	0,70596	-	-	-	P>0,05	P<0,001	P<0,05
7	0,00309	0,00353	0,6818	P>0,05	P>0,05	P<0,05	P>0,05	P<0,05	P<0,01
8	0,35045	0,19002	0,53084	-	-	-	-	-	-
9	0,34509	0,00984	0,44429	P>0,05	P>0,05	P<0,01	-	-	-
10	0,37849	0,01235	0,77839	P<0,05	P>0,05	P>0,05	-	-	-

6. DISCUSSÃO

Uma das medidas de controle para a esquistossomose é a administração em massa do PZQ (ou “*mass drug administration*”, MDA) em áreas onde a prevalência é igual ou superior a 75%. Ao longo do tempo, a MDA chegou a ser considerada como a principal medida, e a ser erroneamente interpretada como uma medida isoladamente capaz de promover o controle de transmissão. Com o uso do PZQ há uma diminuição significativa da produção de ovos, bem como uma diminuição da sua atividade metabólica após contato com o PZQ (102,103). Esta redução de recurso metabólico pode resultar na ausência de eclosão do miracídio, como também na diminuição do tempo de vida do miracídio e sua locomoção mais lenta.

A movimentação dos miracídios tem importância para o sucesso de transmissão da esquistossomose, visto que o miracídio necessita estar ativamente se movimentando e ter energia suficiente durante o processo de penetração do caramujo, bem como garantir que a rápida instalação e transformação nas formas larvais subsequentes funcione como proteção frente os mecanismos de proteção do hospedeiro. O processo de infecção do caramujo é fundamental para a produção de cercárias, e conseqüentemente para a transmissão continuada da esquistossomose. Os valores de características físicas, de motilidade e comportamentais estimados e descritos para os miracídios variam de acordo com o isolado geográfico, sendo neste trabalho utilizado a linhagem LE de *S. mansoni*.

No ambiente, o miracídio se direciona por fototaxia, permanecendo nas áreas de maior intensidade de luz incidente. Apesar de a luminosidade direcionar o miracídios, o seu efeito sobre a sobrevivência do miracídio não foi significativo, assim como o tipo de ambiente também não apresentou influência significativa entre os grupos. Esses dados corroboram com os achados de Prah em 1978 (46).

A motilidade do miracídio é relacionada com a energia do indivíduo, de forma que no esgotamento da reserva energética o animal não consiga mais se locomover. A temperatura, é o fator mais influente sobre o comportamento do miracídio, visto que em valores altos a velocidade do indivíduo aumenta, sendo a média de 2,2 mm/seg quando a 22°C, e o tempo de vida reduz devido

ao maior gasto de energia (53). Em temperaturas de 15°C, o miracídio apresenta um tempo de vida maior, porém sua motilidade se torna lenta, perdendo sua infectividade, principalmente em temperaturas inferiores à 10°C. Os resultados obtidos neste trabalho confirmam esta relação que coloca oposição a infectividade/mobilidade e a amplitude do tempo de vida dos miracídios: maior longevidade, porém com menor mobilidade não contribui para a efetividade de transmissão e continuidade do ciclo de vida do parasito.

A média estabelecida de tempo de vida dos miracídios é de 5 a 6 horas em temperaturas de 22 a 25°C. Nas primeiras observações a cada 1 hora, a média de vida dos miracídios foi de 5 horas, sendo similar ao descrito por Maldonado (50), entretanto, na segunda observação (cada 30 min), a média obtida foi de 3h35 min. Esta queda na média de sobrevivência se dá pela redução de tempo entre os intervalos de observação, em que de 30 em 30 minutos houve maior interferência, que pode ter sido por diferença de temperatura e luminosidade durante o período de observação no microscópio estereoscópico.

Prah determinou três tipos de movimentação do miracídio baseado apenas na velocidade, de forma que são: ativo, lerdo e letárgico (104). Embora a imprecisão de tomar a movimentação como o indicador de infectividade, este é um artifício usualmente empregado em estudos de dinâmica. Neste trabalho definimos seis categorias de movimentação para a linhagem LE de *S. mansoni*, baseando-se em velocidade juntamente com a atividade ciliar, formato do corpo e coloração. As categorias com velocidade considerável foram as mais frequentes nas primeiras três horas, e após decresceram rapidamente, se tornando a categoria sem movimentação a mais frequente no restante do tempo de monitoramento.

Devido a infectividade do miracídio ser dependente de sua mobilidade, a temperatura se mantém como fator altamente influente. Em nossos resultados determinamos inicialmente uma infectividade de 4 horas, sendo similar aos resultados encontrados por Chernin (51). Nas segundas observações a infectividade média é de 2h30, corroborando os dados de Maldonado, que descreveu infectividade de 66,6% até 2 horas de vida. Diferentemente dos outros estudos, que avaliaram a infectividade pelo

número de *Biomphalarias* infectadas após 30 dias de infecção, nossa avaliação foi baseada no tempo em que os miracídios permaneceram com velocidade suficiente para se locomover na placa.

Avaliando-se a infectividade nos grupos, não houve diferença estatística quando comparados, ou quando foram comparados ambientes com e sem luz. Prah também avaliou o efeito da luminosidade sobre a infectividade, não encontrando diferença significativa quando comparou ambientes escuros com luminosos (104). Na segunda observação de motilidade, menos de 50% dos miracídios apresentaram infectividade após 3h, enquanto na primeira observação a infectividade foi inferior a 50% após 5h. Os valores aqui estabelecidos para infectividade e sobrevivência divergem dos descritos por Prah, em que descreveu um tempo de vida de 15h e infectividade de 80 a 100% até 8h (46).

Analisando o comportamento de locomoção dos miracídios, os movimentos ao longo da vida foram sempre decrescentes, sem que nenhum indivíduo que parou de se movimentar tenha depois retornado à movimentação. Muitos miracídios pareceram ter a metade inferior do seu corpo paralisada enquanto a superior se mantinha ativa, dando a impressão de o miracídio estar “preso”. A movimentação do miracídio não foi linear, e os indivíduos permaneciam mais próximos das bordas das placas. Os miracídios apresentam uma tendência a permanecer próximo às bordas, um fenômeno que se observou nas análises aqui realizadas, podendo ocorrer um sensorial e respostas às diferenças na tensão superficial do líquido, o que poderia ser objeto de investigação futura.

A percepção do campo magnético por seres vivos, tem sido amplamente estudada há anos, havendo a descrição desta capacidade para diversos seres tanto para procariotos quanto eucariotos. Com diferentes mecanismos e formas de percepção, estes animais se orientam e modulam alguns comportamentos com base na magnetorecepção. Para platelmintos ainda não há comprovação deste efeito, exceto por observações não sistematizadas com vermes adultos que se aproximaram de magneto colocado numa das extremidades do frasco de cultivo *in vitro* (V. Favero, dados não publicados). No caso do *S. mansoni* a atividade paramagnética foi descrita e estudada extensamente em ovos submetidos a um CM de um ímã,

correspondendo a um polo e na presença de partículas paramagnéticas que se aderem à casca por forças eletrostáticas (105,106). Nos resultados aqui obtidos, apenas houve diferença significativa na velocidade média e/ou frequência de rotação dos indivíduos após a exposição ao CM produzido pela bobina de Helmholtz. Portanto, o efeito na cinemática do miracídio não é observado quando a bobina estava ligada, apenas posteriormente.

As características de sobrevivência e infectividade, diante de diversos fatores que podem afetá-las, foram revisadas e algumas delas foram o objetivo dos experimentos. Estes dados são muito importantes para expandir estes estudos em modelagem matemáticas, contribuindo para a escolha dos parâmetros e o ajustamento dos modelos. Um dos campos em franca expansão é os das modelagens computacionais, como a modelagem baseada em agentes (ABM). Além da interface que representa a dinâmica dos agentes, ABM permite a repetição das simulações, armazenamento e análise estatística dos dados obtidos, de forma automatizada.

As modelagens matemáticas permitem uma predição próxima ao cenário real, de forma que as estimativas de mobilidade e sobrevivência aqui descritas auxiliarão em um modelo mais fidedigno da interação entre miracídio e seu hospedeiro, bem como de modelos que exploram a dinâmica da infectividade que fundamenta a eficácia de transmissão. A construção destes modelos se faz necessária para auxiliar estratégias de controle visando a eliminação da transmissão da esquistossomose, bem como podem explorar um limiar em que haja a extinção espontânea ou induzida da transmissão.

Como esperado das simulações em ABM, a taxa de caramujos infectados aumentou em proporção ao aumento de PopM e PopS. À medida que aumenta o número de agentes em um ambiente, isto facilita o contato do parasito com seu hospedeiro, conseqüentemente aumenta o número de animais infectados. A redução do PopS diminui a probabilidade de infecção, no entanto se PopM não diminuir juntamente, a prevalência pode se manter, e o mesmo acontece com o cenário inverso. Desta forma para reduzir as taxas de infecções é necessário o controle de ambas as populações.

Portanto, para os objetivos estipulados no recentemente divulgado *Road Map 2021-2030*, principalmente o controle que leva à interrupção da

transmissão, com a integração de múltiplas ações, tanto afetando a população de caramujos, quanto a população de humanos infectados, a modelagem com base nos dados já existentes se mostra uma alternativa interessante para avaliar e ajustar as intervenções com maior probabilidade de efetividade. Os exercícios de simulação também possuem muita utilidade para definir o grau mínimo necessário de sensibilidade dos métodos diagnósticos que irão orientar as etapas finais e eventualmente certificar a desejada interrupção de transmissão da esquistossomose e sua eliminação definitiva como problema de saúde pública global.

Por conseguinte, a partir da abordagem deste trabalho e os resultados aqui encontrados, tem-se a perspectiva de que estes auxiliem principalmente na escolha de metodologias de intervenções para a interrupção da esquistossomose. Além disso, aqui contribuímos para uma melhor compreensão da biologia do miracídio de *S. mansoni* de linhagem LE.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO | Schistosomiasis elimination: refocusing on snail control to sustain progress. WHO [Internet]. 2020 [cited 2020 May 18]; Available from: https://www.who.int/neglected_diseases/news/schisto-elimination-refocusing-snail-control-sustain-progress/en/#.XsK8mBs62UY.mendeley
2. WHO. Schistosomiasis: number of people treated worldwide in 2013 Background. *Wkly Epidemiol Rec* [Internet]. 2015;376(5):25–32. Available from: <http://www.who.int/wer/2015/wer9005.pdf>
3. Zoni AC, Catalá L, Ault SK. Schistosomiasis Prevalence and Intensity of Infection in Latin America and the Caribbean Countries, 1942-2014: A Systematic Review in the Context of a Regional Elimination Goal. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2016;10(3).
4. WHO. Schistosomiasis [Internet]. 2020. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis>
5. BRASIL M da S. Educação em Saúde para o controle da esquistossomose [Internet]. 2018. Available from: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/educacao_saude_controle_esquistossomose.pdf
6. Pearce EJ, MacDonald AS. The immunobiology of schistosomiasis. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2002;2(7):499–511. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nri843>
7. Silva-Moraes V, Shollenberger LM, Siqueira LMV, Castro-Borges W, Harn DA, Queiroz E Grenfell RF, et al. Diagnosis of schistosoma mansoni infections: What are the choices in brazilian low-endemic areas? *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2019.
8. Alan Wilson R, van Dam GJ, Kariuki TM, Farah IO, Deelder AM, Coulson PS. The detection limits for estimates of infection intensity in schistosomiasis mansoni established by a study in non-human primates. *International Journal for Parasitology* 2006;
9. Teixeira CF, Neuhauss E, Ben R, Romanzini J, Graeff-Teixeira C. Detection of *Shistosoma mansoni* eggs in feces through their interaction with paramagnetic beads in a magnetic field. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2007;1(2):1–5.

10. Lindholz CG, Favero V, Verissimo C de M, Candido RRF, de Souza RP, dos Santos RR, et al. Study of diagnostic accuracy of Helmintex, Kato-Katz, and POC-CCA methods for diagnosing intestinal schistosomiasis in Candeal, a low intensity transmission area in northeastern Brazil. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2018;12(3):e0006274. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0006274>
11. Ministério da Saúde. Vigilância da Esquistossomose Mansoni: Diretrizes Técnicas. 2014.
12. WHO/Department of Control of Neglected Tropical Diseases. Schistosomiasis and soiltransmitted helminthiases: numbers of people treated in 2017. *Wkly Epidemiol Rec* [Internet]. 2018;16(93):201–20. Available from: <http://www.who.int/wer>
13. WHO (World Health Organization). Schistosomiasis and soil-transmitted helminth infections. *Relev Epidemiol Hebd*. 2001;76(10):74–6.
14. WHA (World Health Organization). SIXTY-FIFTH WORLD HEALTH ASSEMBLY. 2012.
15. WHO. Ending the neglect to attain the sustainable development goals. 2021;
16. Huang SCC, Freitas TC, Amiel E, Everts B, Pearce EL, Lok JB, et al. Fatty Acid Oxidation Is Essential for Egg Production by the Parasitic Flatworm *Schistosoma mansoni*. *PLoS Pathogens*, 2012;
17. Kunz W, Gohr L, Grevelding C, Schüssler P, Sommer G, Menrath M, et al. *Schistosoma mansoni*: control of female fertility by the male. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1995;90(2):185–9.
18. El Ridi R, Ozaki T, Inaba T, Ito M, Kamiya H. *Schistosoma mansoni* oviposition in vitro reflects worm fecundity in vivo: Individual-, parasite age- and host-dependent variations. *International Journal for Parasitology*. 1997;
19. Michaels RM, Prata A. Evolution and Characteristics of *Schistosoma mansoni* Eggs Laid In vitro. *The Journal of Parasitology*. 1968;
20. Michaels RM. Mating of *Schistosoma mansoni* in Vitro. *Experimental Parasitology*. 1969;
21. Barth LR, Fernandes APM, Rodrigues V. Oviposition by *Schistosoma mansoni* during in vitro cultivation. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*.

- 1996;
22. Cheever AW, Macedonia JG, Mosimann JE, Cheever EA. Kinetics of egg production and egg excretion by *Schistosoma mansoni* and *S. japonicum* in mice infected with a single pair of worms. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1994;50(3):281–95.
 23. Moore DV, Sandground JH. The relative egg producing capacity of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1956;5(5):831–40.
 24. Moore DL, Grove DI, Warren KS. The *Schistosoma mansoni* egg granuloma: Quantitation of cell populations. *Journal of Pathology*. 1977;
 25. Ferrari TCA, Moreira PRR. Neuroschistosomiasis: Clinical symptoms and pathogenesis. *The Lancet Neurology*. 2011.
 26. Carvalho S, Coelho PMZ, Lenzi, HL. *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2008. 1124 p. ISBN 978-85-7541-370-8.
 27. Mason PR, Fripp PJ. The Reactions of *Schistosoma mansoni* Miracidia to Light. *The Journal of Parasitology*. 1977;
 28. Pan SC tung. The fine structure of the miracidium of *Schistosoma mansoni*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 1980;
 29. LoVerde PT. Scanning electron microscope observations on the miracidium of *Schistosoma*. *International Journal for Parasitology*. 1975;
 30. Wajdi N. Penetration by the Miracidia of *S. mansoni* into the Snail Host. *Journal of Helminthology*. 1966;
 31. Bahia D, Avelar LGA, Vigorosi F, Cioli D, Oliveira GC, Mortara RA. The distribution of motor proteins in the muscles and flame cells of the *Schistosoma mansoni* miracidium and primary sporocyst. *Parasitology*. 2006;
 32. Tielens AGM, van de Pas FAM, van den Heuvel JM, van den Bergh SG. The aerobic energy metabolism of *Schistosoma mansoni* miracidia. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1991;46(1):181–4.
 33. Galanti SE, Huang SCC, Pearce EJ. Cell death and reproductive regression in female *Schistosoma mansoni*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2012;

34. Zamanian M, Kimber MJ, McVeigh P, Carlson SA, Maule AG, Day TA. The repertoire of G protein-coupled receptors in the human parasite *Schistosoma mansoni* and the model organism *Schmidtea mediterranea*. *BMC Genomics*. 2011;
35. Patocka N, Sharma N, Rashid M, Ribeiro P. Serotonin Signaling in *Schistosoma mansoni*: A Serotonin-Activated G Protein-Coupled Receptor Controls Parasite Movement. *PLoS Pathogens*, 2014;10(1).
36. Liang D, Zhao M, Wang T, McManus DP, Cummins SF. GPCR and IR genes in *Schistosoma mansoni* miracidia. *Parasites and Vectors*. 2016;
37. Jurberg AD, Gonçalves T, Costa TA, Mattos ACA, Pascarelli BM, Manso PPA, et al. The embryonic development of *Schistosoma mansoni* eggs: Proposal for a new staging system. *Development Genes and Evolution*. 2009;
38. Liberatos JD, Short RB. Identification of Sex of Schistosome Larval Stages. *Journal of Parasitology*. 1983;
39. Ashton PD, Harrop R, Shah B, Wilson RA. The schistosome egg: Development and secretions. *Parasitology*. 2001;122(3):329–38.
40. Jurberg AD, Gonçalves T, Costa TA, Mattos ACA, Pascarelli BM, Manso PPA, et al. The embryonic development of *Schistosoma mansoni* eggs: Proposal for a new staging system. *Development Genes and Evolution*. 2009;219(5):219–34.
41. Xu YZ, Dresden MH. The hatching of schistosome eggs. *Experimental Parasitology*. 1990.
42. Kassim O, Gilbertson DE. Hatching of *Schistosoma mansoni* Eggs and Observations on Motility of Miracidia. *Journal of Parasitology*. 2006;
43. Samuelson JC, Quinn JJ, Caulfield JP. Hatching, Chemokinesis, and Transformation of Miracidia of *Schistosoma mansoni*. *Journal of Parasitology*. 1984;
44. Roberts TM, Ward S, Chernin E. Behavioral Responses of *Schistosoma mansoni* Miracidia in Concentration Gradients of Snail-Conditioned Water. *Journal of Parasitology*. 1979;
45. Mason PR, Fripp PJ. Analysis of the Movements of *Schistosoma mansoni* Miracidia Using Dark-Ground Photography. *Journal of Parasitology*. 1976;
46. Prah SK, James C. The influence of physical factors on the behaviour and

- infectivity of miracidia of *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium*. II. Effect of light and depth. *Journal of Helminthology*. 1978;
47. Morley NJ. Thermodynamics of miracidial survival and metabolism. *Parasitology*. 2012;
 48. Maldonado JF, Acosta Matienzo J, Thillet CJ. Biological studies on the miracidium of *Schistosoma mansoni*; behavior of the unhatched miracidium in undiluted stools under diverse environmental conditions. *The Puerto Rico journal of public health and tropical medicine*. 1949;
 49. Benex, J. ; Deschiens R. Incidence des facteurs externes sur la longévité et la vitalité des miracidiums de *Schistosoma mansoni*. *Bulletin de la Société de pathologie exotique et de ses*. 1963;56(5):987–92.
 50. Maldonado JF, Acosta-Matienzo J. Biological Studies on the Miracidium of *Schistosoma Mansoni*: Part 1. Hatchability, longevity and infectivity of the miracidium of *Schistosoma mansoni*. *American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1948;
 51. Chernin E. Interference with the Capacity of *Schistosoma mansoni* Miracidia to Infect the Molluscan Host. *Journal of Parasitology*. 1968;
 52. Chernin E, Antolics VM. Penetrative Capacity of *Schistosoma mansoni* Miracidia. *Journal of Parasitology*. 1975;
 53. Nguyen KH, Gemmell BJ, Rohr JR. Effects of temperature and viscosity on miracidial and cercarial movement of *Schistosoma mansoni*: ramifications for disease transmission. *International Journal for Parasitology*. 2020;
 54. Sturrock RF, Upatham ES. An investigation of the interactions of some factors influencing the infectivity of *Schistosoma mansoni* miracidia to *Biomphalaria glabrata*. *International Journal for Parasitology*. 1973;
 55. Wang T, Wyeth RC, Liang D, Bose U, Ni G, McManus DP, et al. A *Biomphalaria glabrata* peptide that stimulates significant behaviour modifications in aquatic free-living *Schistosoma mansoni* miracidia. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2019;
 56. Haberl B, Kalbe M, Fuchs H, Ströbel M, Schmalfluss G, Haas W. *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium*: Miracidial host-finding behaviour is stimulated by macromolecules. *International Journal for Parasitology*. 1995;
 57. Chernin E. Penetrative Activity of *Schistosoma mansoni* Miracidia Stimulated by

- Exposure to Snail-Conditioned Water. *Journal of Parasitology*. 1972;
58. Kalbe M, Haberl B, Hertel J, Haas W. Heredity of specific host-finding behaviour in *Schistosoma mansoni* miracidia. *Parasitology*. 2004;
 59. Gerard C, Mone H, Theron A. *Schistosoma mansoni*-*Biomphalaria glabrata*: dynamics of the sporocyst population in relation to the miracidial dose and the host size. *Canadian Journal of Zoology*. 1993;
 60. Yoshino TP, Cheng TC. Snail Host-Like Antigens Associated with the Surface Membranes of *Schistosoma mansoni* Miracidia. *Journal of Parasitology*. 1978;
 61. Lehr T, Geyer H, Maaß K, Doenhoff MJ, Geyer R. Structural characterization of N-glycans from the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* cross-reacting with *Schistosoma mansoni* glycoconjugates. *Glycobiology*. 2007;
 62. Yoshino TP, Bayne CJ. Mimicry of snail host antigens by miracidia and primary sporocysts of *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunology*. 1983;
 63. Crews AE, Yoshino TP. *Schistosoma mansoni*: Effect of infection on reproduction and gonadal growth in *Biomphalaria glabrata*. *Experimental Parasitology*. 1989;
 64. Garcia AB, Pierce RJ, Gourbal B, Werkmeister E, Colinet D, Reichhart JM, et al. Involvement of the cytokine MIF in the snail host immune response to the parasite *Schistosoma mansoni*. *PLoS Pathogens* 2010;
 65. Zhang SM, Loker ES. Representation of an immune responsive gene family encoding fibrinogen-related proteins in the freshwater mollusc *Biomphalaria glabrata*, an intermediate host for *Schistosoma mansoni*. *Gene*. 2004;
 66. Théron A, Rognon A, Pagès JR. Host choice by larval parasites: A study of *Biomphalaria glabrata* snails and *Schistosoma mansoni* miracidia related to host size. *Parasitology Research*. 1998;
 67. Combes C, Moné H. Possible mechanisms of the decoy effect in *Schistosoma mansoni* transmission. *International Journal for Parasitology*. 1987;
 68. Etges FJ, Decker CL. Chemosensitivity of the Miracidium of *Schistosoma mansoni* to *Australorbis glabratus* and Other Snails. *Journal of Parasitology*. 1963;
 69. Michelson EH. The Protective Action of *Chaetogaster limnaei* on Snails Exposed to *Schistosoma mansoni*. *Journal of Parasitology*. 1964;
 70. Boissier J, Moné H. Male-female larval interactions in *Schistosoma mansoni*-

- infected *Biomphalaria glabrata*. *International Journal for Parasitology*. 2001;
71. Mangal TD, Paterson S, Fenton A. Effects of snail density on growth, reproduction and survival of *biomphalaria alexandrina* exposed to *schistosoma mansoni*. *Journal of Parasitology Research*. 2010;
 72. Lee FO, Cheng TC. *Schistosoma mansoni* infection in *Biomphalaria glabrata*: Alterations in heart rate and thermal tolerance in the host. *Journal of Invertebrate Pathology*. 1971;
 73. Meier M, Meier-Brook C. *Schistosoma mansoni*: Effect on growth, fertility, and development of distal male organs in *Biomphalaria glabrata* exposed to miracidia at different ages. *Zeitschrift für Parasitenkd Parasitology Research*. 1981;
 74. Etges FJ, Gresso W. Effect of *Schistosoma mansoni* Infection upon Fecundity in *Australorbis glabratus*. *Journal of Parasitology*. 1965;
 75. Lefcort H, Bayne CJ. Thermal preferences of resistant and susceptible strains of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda) exposed to *Schistosoma mansoni* (Trematoda). *Parasitology*. 1991;
 76. Stirewalt MA. Effect of snail maintenance temperatures on development of *Schistosoma mansoni*. *Experimental Parasitology*. 1954;
 77. Richards CS. Genetic factors in susceptibility of *Biomphalaria glabrata* for different strains of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology*. 1975;
 78. Richards CS, Knight M, Lewis FA. Genetics of *Biomphalaria glabrata* and its effect on the outcome of *Schistosoma mansoni* infection. *Parasitology Today*. 1992;
 79. Ittiprasert W, Knight M. Reversing the resistance phenotype of the *biomphalaria glabrata* snail host *schistosoma mansoni* infection by temperature modulation. *PLoS Pathogens*, 2012;
 80. Shaw J, Boyd A, House M, Woodward R, Mathes F, Cowin G, et al. Magnetic particle-mediated magnetoreception. *Journal of the Royal Society Interface*. 2015.
 81. Johnsen S, Lohmann KJ. The physics and neurobiology of magnetoreception. *Nature Reviews Neuroscience*. 2005.
 82. Hore PJ, Mouritsen H. The Radical-Pair Mechanism of Magnetoreception. *Annual Review of Biophysics*. 2016;
 83. Wiltschko R, Wiltschko W. Magnetoreception. *BioEssays*. 2006.

84. Acosta-Avalos D. Detecção dos campos magnéticos pelos seres vivos. 1st ed. São Paulo: Livraria da Física; 2012. 94 p.
85. Monteil CL, Menguy N, Prévéral S, Warren A, Pignol D, Lefèvre CT. Accumulation and dissolution of magnetite crystals in a magnetically responsive ciliate. *Applied and Environmental Microbiology*. 2018;
86. Martins JL, Silveira TS, Abreu F, Silva KT, Da Silva-Neto ID, Lins U. Grazing protozoa and magnetosome dissolution in magnetotactic bacteria. *Environmental Microbiology*. 2007;
87. Monteil CL, Vallenet D, Menguy N, Benzerara K, Barbe V, Fouteau S, et al. Ectosymbiotic bacteria at the origin of magnetoreception in a marine protist. *Nature Microbiology*. 2019.
88. Monteil CL, Lefevre CT. Magnetoreception in Microorganisms. *Trends in Microbiology*. 2020.
89. de Araujo FFT, Pires MA, Frankel RB, Bicudo CEM. Magnetite and Magnetotaxis in Algae. *Biophysical Journal*. 1986;
90. Cain SD, Wang JH, Lohmann KJ. Immunochemical and electrophysiological analyses of magnetically responsive neurons in the mollusc *Tritonia diomedea*. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology I*. 2006;
91. Willows AOD. Shoreward orientation involving geomagnetic cues in the nudibranch mollusc *Tritonia diomedea*. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*. 1999;
92. Sinsch U. Orientation and navigation in Amphibia. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*. 2006;
93. Diego-Rasilla FJ, Luengo RM, Phillips JB. Use of a magnetic compass for nocturnal homing orientation in the palmate newt, *Lissotriton helveticus*. *Ethology*. 2008;
94. Wajnberg E, Acosta-Avalos D, Alves OC, De Oliveira JF, Srygley RB, Esquivel DMS. Magnetoreception in eusocial insects: An update. *Journal of the Royal Society Interface*. 2010.
95. O'Connell CP, Abel DC, Rice PH, Stroud EM, Simuro NC. Responses of the southern stingray (*Dasyatis americana*) and the nurse shark (*Ginglymostoma*

- cirratum) to permanent magnets Marine and Freshwater Behaviour and Physiology. 2010;
96. Meyer CG, Holland KN, Papastamatiou YP. Sharks can detect changes in the geomagnetic field. *Journal of the Royal Society Interface*. 2005;
 97. Rodda GH. The orientation and navigation of juvenile alligators: evidence of magnetic sensitivity. *Journal of Comparative Physiology A*. 1984;
 98. Wiltschko R, Wiltschko W. Magnetoreception in birds. *Journal of the Royal Society Interface*. 2019.
 99. Wiltschko W, Gesson M, Stapput K, Wiltschko R. Light-dependent magnetoreception in birds: Interaction of at least two different receptors. *Naturwissenschaften*. 2004;
 100. Maurer RL. Mecanismo de interação magnética dos ovos de *Schistosoma* spp . e características biológicas da cepa Esteio , Rio Grande do Sul. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2012.
 101. Karl S, Gutiérrez L, Lucyk-Maurer R, Kerr R, Candido RRF, Toh SQ, et al. The Iron Distribution and Magnetic Properties of Schistosome Eggshells: Implications for Improved Diagnostics. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2013;
 102. Shaw MK, Erasmus DA. *Schistosoma mansoni*: Praziquantel-induced changes to the female reproductive system. *Experimental Parasitology*. 1988;
 103. Richards F, Sullivan J, Ruiz-Tiben E, Eberhard M, Bishop H. Effect of praziquantel on the eggs of *Schistosoma mansoni*, with a note on the implications for managing central nervous schistosomiasis. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 1989;
 104. Prah SK, James C. The influence of physical factors on the survival and infectivity of miracidia of *Schistosoma mansoni* and *S. Haematobium* i. effect of temperature and ultra-violet light. *Journal of Helminthology*. 1977;
 105. Karl S, Gutiérrez L, Lucyk-Maurer R, Kerr R, Candido RRF, Toh SQ, et al. The Iron Distribution and Magnetic Properties of Schistosome Eggshells: Implications for Improved Diagnostics. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2013;7(5).
 106. Candido RRF, Favero V, Duke M, Karl S, Gutiérrez L, Woodward RC, et al. The affinity of magnetic microspheres for *Schistosoma* eggs. *International Journal for Parasitology*. 2015;

8. ANEXOS

8.1. Código do modelo na linguagem NetLogo

```

breed [ snails snail ] ; agentset of snails is created
breed [news new]; to create new snails in th midle of the time
breed [ miracidia miracidium ] ; agentset of miracidia is created

turtles-own [
  miracidia-energy
  infected?
  miracidia-infectable ;; some miracidia are infectable
  ;;here we overestimate de infectability because the literature data aren't well consolidate
  reintroduce-Miracidia ;; continuous contaminated feces in water
  prob-autocura
  infected-snails
]

patches-own [
  ;; Miracidia are attracted by substances released by snails.
  ;; The presence of "attractant" will be represented by the color of patches
  attractant
]

globals [ ;; to miracidia iniciate differents positions
  miracidia-global-x
  miracidia-global-y
]
;;;;;;;;;;;;;
;;;  setup procedures ;;;;;;;;;;
;;;;;;;;;;;;;

to setup
clear-all
reset-ticks

set miracidia-global-x random 32      ;; to miracidia iniciate togheter
set miracidia-global-y random 32

;; creates miracidia
create-miracidia initial-number-miracidia
ask turtles [
  set size 0.3

```

```

set color yellow
setxy miracidia-global-x miracidia-global-y
;; the initial localization of miracidia at the focal point where feces were released
set miracidia-energy initial-miracidia-energy
;;sets the initial miracidia (M) energy; it defines M lifespan as each tick M energy decreases
set miracidia-infectable random 10

]

;; creates snails
create-snails initial-number-snails
ask snails [
  set size 6
  set shape "bionf"
  set color white
  setxy random-xcor random-ycor ;; the initial random localization of snails spreading over the world
  ;; Neither Snail energy nor lifespan are not a concern in this very first modeling of snail-miracidia interaction
  ;; since snail lifespan as compared to Miracidia lifespan is aprox 90 times higher
  set prob-autocura random 10
]

;; initialization of patches, to represent the releasing of Miracidia attractant by the snails into the environment
ask patches [ set attractant 0 ]

end

;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;
;;;;; to go procedures ;;;;;;;;;;
;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;

to go
if not any? miracidia [ stop ] ;; stops the running when all the M agents have died
ask miracidia [ ;; miracidia procedure to randomly swim
  move-turtles

  if temperature < 21 and viscosity > 50 [set miracidia-energy miracidia-energy - 3]
  ;; temperature with the viscosity influence the miracidia energy and his life time
  if temperature < 21 and viscosity < 50 [set miracidia-energy miracidia-energy - 4]
  if temperature > 21 and viscosity < 50 [set miracidia-energy miracidia-energy - 1]

```

```

;; best environment combination for the best performance of the miracidia
if temperature > 21 and viscosity > 50 [set miracidia-energy miracidia-energy - 2]
if temperature > 30 and viscosity < 50 [set miracidia-energy miracidia-energy - 3]
;; temperature is higher than viscosity will reduce the time

if lightness > 2000 [set miracidia-energy miracidia-energy - 2]
if lightness < 2000 [set miracidia-energy miracidia-energy - 1]
if lightness < 1000 [set miracidia-energy miracidia-energy - 3]
;;; In dark environments the infection rate decrease

if temperature > 10 [
  infect-snails]

  check-death
]
ask snails [ ;; snails procedure to randomly swim
move-turtles
]

ask miracidia [
  if attractant > M-sensing-threshold
  [ turn-toward-attractant ]
  rt random-float wiggle-angle - random-float wiggle-angle + winggle-bias
  fd 2
]
ask snails [ ;; snails release "attractant"
  set attractant attractant + 4
]
diffuse attractant 1 ;; the attractant diffuses in the water ;; 0 to 1

ask patches [
  set attractant attractant * attractant-dilution ;; the dilution of the attractant in SCW
  set pcolor scale-color blue
  attractant 0.2 3 ]

if ticks mod 20 = 0 [
  reproduce] ;; in each 50 ticks the snails population grow in half

check-cure

tick

end

;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;
;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;; Functions into to go ;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;
;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;;

to move-turtles
  ;; the movement of miracidia in the surroundings of its original localization
  ;; in order to limit the spread of miracidia, as it happens in real world, I ask them to move a small percentual of a patch each tick
  ;; the M-move is controlled by the output "M-patch-percentual"
  ask miracidia [
    left random 360
    fd M-patch-percentual
  ]
  ;; the movement of snails all over the world
  ask snails [ rt random 360
    fd 1
  ]
end

to turn-toward-attractant
  ; turtles procedure: (Miracidia) to directionally (not randomly) move towards the snails, sources of "attractant"
  let ahead [ attractant ] of patch-ahead 1
  let myright [ attractant ] of patch-right-and-ahead sniff-angle 1
  let myleft [ attractant ] of patch-left-and-ahead sniff-angle 1
  ifelse (myright >= ahead) and (myright >= myleft)
  [ rt sniff-angle ]
  [ if myleft >= ahead
    [left sniff-angle]
  ]
end

```

```

to infect-snails
  ;; turtles (Miracidia and Snails) procedure: when M and S come into close contact, snails becomes infected and change color to red
  if miracidia-energy > 40 and miracidia-infectable > 6 [
    ;; The miracidia energy is fundamental to the ability of infection, and more than 30% of miracidium are incapable to infect
    ask miracidia [
      ask snails in-radius 0.3
      [ set color red ]
    ]
  ]

  ask snails [
    ask miracidia in-radius 0.1 [ die ] ;; miracidia are removed from the world since they had infected (entered) the snails
  ]
end

to check-cure
  if ticks mod 10 = 0 [ ;; +- 30% of snails can destroy miraciia ;;each 5 ticks S cure
    let a count snails with [color = red]
    if a > 1 [
      ask n-of 2 snails with [color = red] [ set color white ]
    ]
    if a = 1 [
      ask n-of 1 snails with [color = red] [ set color white ]
    ]
  ]
end

to reproduce ;; snails reproduction ;; low growth rate
  create-snails (initial-number-snails) / 2 [
    set size 6 ;; much larger than miracidia
    set shape "bionf"
    set color white
    setxy random-xxcor random-ycor]
end

to check-death ;; Miracidia lifespan is short and it is controlled by "miracidia-energy"
  ask miracidia [
    if miracidia-energy <= 0 [ die ]
  ]
end

```

Os textos seguidos de “;” e em cor cinza são comentários, sem agregar aos comandos do modelo.

8.2. Tabela de valores de parâmetros dos tamanhos populacionais das simulações

initial-miracidia-energy	Viscosity	initial-number-miracidia	Temperature	Attractant-dilution	initial-number-snails	Lightness	count turtles	count snails with [color = red]	DesvioPadrão	Number of no infections
100	20	100	25	0.5	100	2500	200	80,9625	13,88047	0
100	20	75	25	0.5	100	2500	200	70,566	14,10334	0
100	20	50	25	0.5	100	2500	200	53,5535	14,45384	0
100	20	25	25	0.5	100	2500	200	27,0185	12,2626	23
100	20	20	25	0.5	100	2500	200	19,747	10,67928	58
100	20	15	25	0.5	100	2500	200	12,828	8,717363	178
100	20	10	25	0.5	100	2500	200	5,3425	5,527429	588
100	20	5	25	0.5	100	2500	200	0,5585	1,457271	1616
100	20	100	25	0.5	75	2500	200	69,892	10,06002	0
100	20	100	25	0.5	50	2500	100	53,4375	6,13742	0
100	20	100	25	0.5	25	2500	49	28,91	2,413465	0
100	20	100	25	0.5	20	2500	40	23,481	1,816945	0
100	20	100	25	0.5	15	2500	29	16,688	1,22123	0
100	20	100	25	0.5	10	2500	20	10,365	0,811236	0
100	20	100	25	0.5	5	2500	9	2,8265	0,401844	0
100	20	5	25	0.5	5	2500	9	0	0	2000
100	20	5	25	0.5	10	2500	20	0	0	2000
100	20	10	25	0.5	5	2500	9	0	0	2000
100	20	10	25	0.5	10	2500	20	0,003	0,06319	1995
100	20	15	25	0.5	10	2500	20	0,104	0,44529	1866
100	20	10	25	0.5	15	2500	29	0,0365	0,251395	1949
100	20	15	25	0.5	15	2500	29	0,473	1,118882	1567
100	20	20	25	0.5	15	2500	29	1,693	2,00668	844
100	20	15	25	0.5	20	2500	40	1,281	1,908104	1119
100	20	20	25	0.5	20	2500	40	3,5255	3,059744	468
100	20	25	25	0.5	20	2500	40	6,1865	3,655051	136
100	20	20	25	0.5	25	2500	49	4,93	3,667537	303
100	20	25	25	0.5	25	2500	49	8,1865	4,242843	78
100	20	25	25	0.5	30	2500	60	10,4405	4,993789	51
100	20	30	25	0.5	30	2500	60	14,212	5,269055	17
100	20	30	25	0.5	25	2500	49	11,413	4,579838	26
100	20	30	25	0.5	35	2500	69	16,229	6,089754	13
100	20	35	25	0.5	35	2500	69	19,2535	6,071464	10
100	20	35	25	0.5	30	2500	60	17,0075	5,436655	3
100	20	35	25	0.5	40	2500	80	21,9035	6,752554	2
100	20	40	25	0.5	40	2500	80	25,4415	6,860766	1
100	20	40	25	0.5	35	2500	69	22,6595	5,932298	0
100	20	40	25	0.5	45	2500	89	27,798	7,44264	1
100	20	45	25	0.5	45	2500	89	30,781	7,412052	0
100	20	45	25	0.5	40	2500	80	28,309	6,747168	0

100	20	45	25	0.5	50	2500	100	33,542	8,327419	0
100	20	50	25	0.5	50	2500	100	36,142	8,158316	0
100	20	50	25	0.5	45	2500	89	33,5865	7,305491	0
100	20	55	25	0.5	50	2500	100	39,175	8,118826	0
100	20	55	25	0.5	55	2500	109	41,7105	8,625015	0
100	20	50	25	0.5	55	2500	109	38,767	8,680345	0
100	20	60	25	0.5	55	2500	109	43,788	8,409305	0
100	20	60	25	0.5	60	2500	120	47,0855	9,375774	0
100	20	55	25	0.5	60	2500	120	43,683	9,464476	0
100	20	65	25	0.5	60	2500	120	49,341	9,200709	0
100	20	65	25	0.5	65	2500	129	51,608	9,811854	0
100	20	60	25	0.5	65	2500	129	48,7375	10,04898	0
100	20	70	25	0.5	65	2500	129	53,962	9,589658	0
100	20	70	25	0.5	70	2500	140	56,449	10,28651	0
100	20	65	25	0.5	70	2500	140	53,926	10,55638	0
100	20	75	25	0.5	70	2500	140	58,4745	10,31996	0
100	20	75	25	0.5	75	2500	149	60,961	10,95292	0
100	20	70	25	0.5	75	2500	149	58,456	11,27864	0
100	20	80	25	0.5	75	2500	149	62,792	10,83187	0
100	20	80	25	0.5	80	2500	160	65,3925	11,34102	0
100	20	75	25	0.5	80	2500	160	62,9445	11,90795	0
100	20	80	25	0.5	80	2500	160	65,5915	11,51373	0
100	20	75	25	0.5	80	2500	160	62,9915	11,42833	0
100	20	85	25	0.5	80	2500	160	67,511	11,36724	0
100	20	85	25	0.5	85	2500	169	69,225	12,31681	0
100	20	80	25	0.5	85	2500	169	67,456	12,11086	0
100	20	90	25	0.5	85	2500	169	71,231	12,03548	0
100	20	90	25	0.5	90	2500	180	73,903	12,75925	0
100	20	85	25	0.5	90	2500	180	71,5435	13,06113	0
100	20	95	25	0.5	90	2500	180	75,261	12,91066	0
100	20	95	25	0.5	95	2500	189	77,324	13,28157	0
100	20	90	25	0.5	95	2500	189	75,4955	13,0012	0
100	20	100	25	0.5	95	2500	189	79,5985	12,57641	0
100	20	95	25	0.5	100	2500	200	79,0305	14,08319	0
100	20	100	25	0.5	30	2500	60	34,922	3,19036	0
100	20	100	25	0.5	35	2500	69	39,7125	3,833155	0
100	20	100	25	0.5	40	2500	80	44,8355	4,582693	0
100	20	100	25	0.5	45	2500	89	48,9545	5,396487	0
100	20	100	25	0.5	55	2500	109	56,8445	7,028969	0
100	20	100	25	0.5	60	2500	120	60,6405	7,901322	0
100	20	100	25	0.5	65	2500	129	63,952	8,746799	0
100	20	100	25	0.5	70	2500	140	66,751	9,246175	0
100	20	100	25	0.5	80	2500	160	72,6585	11,03213	0
100	20	100	25	0.5	85	2500	169	75,141	11,51695	0
100	20	100	25	0.5	90	2500	180	76,754	12,55949	0

100	20	30	25	0.5	100	2500	200	33,4255	12,75092	3
100	20	35	25	0.5	100	2500	200	38,6455	13,21725	2
100	20	40	25	0.5	100	2500	200	44,636	14,18968	0
100	20	45	25	0.5	100	2500	200	48,7905	14,14483	0
100	20	55	25	0.5	100	2500	200	57,575	14,84761	0
100	20	60	25	0.5	100	2500	200	60,97	14,8371	0
100	20	65	25	0.5	100	2500	200	64,4005	14,81122	0
100	20	70	25	0.5	100	2500	200	67,2245	14,3999	0
100	20	80	25	0.5	100	2500	200	72,6075	14,44058	0
100	20	85	25	0.5	100	2500	200	75,1425	13,88099	0
100	20	90	25	0.5	100	2500	200	77,865	14,23196	0
100	20	15	25	0.5	5	2500	9	0,0015	0,04999	1997
100	20	20	25	0.5	5	2500	9	0,0105	0,115743	1981
100	20	25	25	0.5	5	2500	9	0,0435	0,237981	1927
100	20	30	25	0.5	5	2500	9	0,143	0,437763	1775
100	20	35	25	0.5	5	2500	9	0,311	0,630913	1545
100	20	40	25	0.5	5	2500	9	0,5665	0,821434	1234
100	20	45	25	0.5	5	2500	9	0,822	0,921437	945
100	20	50	25	0.5	5	2500	9	1,1865	1,009219	627
100	20	55	25	0.5	5	2500	9	1,489	1,016999	416
100	20	60	25	0.5	5	2500	9	1,8025	0,968114	230
100	20	65	25	0.5	5	2500	9	2,0345	0,895084	124
100	20	70	25	0.5	5	2500	9	2,244	1,92341	80
100	20	75	25	0.5	5	2500	9	2,41	1,21112	45
100	20	80	25	0.5	5	2500	9	2,513	0,822587	23
100	20	85	25	0.5	5	2500	9	2,6245	0,596013	6
100	20	90	25	0.5	5	2500	9	2,7185	0,520165	1
100	20	95	25	0.5	5	2500	9	2,7835	0,463064	3
100	20	5	25	0.5	15	2500	29	0	0	2000
100	20	5	25	0.5	20	2500	40	0,0005	0,022361	1997
100	20	5	25	0.5	25	2500	49	0,003	0,070665	1995
100	20	5	25	0.5	30	2500	60	0,0095	0,139354	1987
100	20	5	25	0.5	35	2500	69	0,0145	0,15589	1978
100	20	5	25	0.5	40	2500	80	0,032	0,293289	1961
100	20	5	25	0.5	45	2500	89	0,044	0,325755	1949
100	20	5	25	0.5	50	2500	100	0,0755	0,441468	1915
100	20	5	25	0.5	55	2500	109	0,0955	0,485276	1894
100	20	5	25	0.5	60	2500	120	0,1295	0,61148	1872
100	20	5	25	0.5	65	2500	129	0,171	0,739607	1843
100	20	5	25	0.5	70	2500	140	0,2125	0,822593	1817
100	20	5	25	0.5	75	2500	149	0,2695	0,943546	1764
100	20	5	25	0.5	80	2500	160	0,303	0,987235	1742
100	20	5	25	0.5	85	2500	169	0,4045	1,212655	1696
100	20	5	25	0.5	90	2500	180	0,468	1,326919	1674
100	20	5	25	0.5	95	2500	189	0,5025	1,344906	1629

100	20	10	25	0.5	20	2500	40	0,1395	0,552433	1837
100	20	10	25	0.5	25	2500	49	0,3215	0,921689	1700
100	20	10	25	0.5	30	2500	60	0,6375	1,360447	1485
100	20	10	25	0.5	35	2500	69	0,917	1,700922	1355
100	20	10	25	0.5	40	2500	80	1,233	2,067387	1239
100	20	10	25	0.5	45	2500	89	1,6575	2,517735	1104
100	20	10	25	0.5	50	2500	100	2	2,852292	992
100	20	10	25	0.5	55	2500	109	2,447	3,282161	931
100	20	10	25	0.5	60	2500	120	2,7945	3,486609	834
100	20	10	25	0.5	65	2500	129	3,094	3,851726	801
100	20	10	25	0.5	70	2500	140	3,4545	4,059088	763
100	20	10	25	0.5	75	2500	149	3,6855	4,302004	745
100	20	10	25	0.5	80	2500	160	4,198	4,602127	659
100	20	10	25	0.5	85	2500	169	4,495	4,820936	641
100	20	10	25	0.5	90	2500	180	4,8455	5,099993	618
100	20	10	25	0.5	95	2500	189	5,0865	5,247257	594
100	20	20	25	0.5	10	2500	20	0,513	1,030166	1468
100	20	25	25	0.5	10	2500	20	1,346	1,61607	916
100	20	30	25	0.5	10	2500	20	2,49	2,049117	453
100	20	35	25	0.5	10	2500	20	3,865	2,284376	196
100	20	40	25	0.5	10	2500	20	4,957	2,222751	66
100	20	45	25	0.5	10	2500	20	6,0015	2,169412	27
100	20	50	25	0.5	10	2500	20	6,9095	1,999268	3
100	20	55	25	0.5	10	2500	20	7,633	1,808004	0
100	20	60	25	0.5	10	2500	20	8,201	1,665913	0
100	20	65	25	0.5	10	2500	20	8,686	1,521291	0
100	20	70	25	0.5	10	2500	20	9,133	1,443633	0
100	20	75	25	0.5	10	2500	20	9,4625	1,292022	0
100	20	80	25	0.5	10	2500	20	9,7365	1,166824	0
100	20	85	25	0.5	10	2500	20	9,9585	1,037717	0
100	20	90	25	0.5	10	2500	20	10,099	0,979323	0
100	20	95	25	0.5	10	2500	20	10,294	0,871267	0
100	20	15	25	0.5	25	2500	49	2,162	2,617029	849
100	20	15	25	0.5	30	2500	60	3,0095	3,176622	673
100	20	15	25	0.5	35	2500	69	3,9475	3,719304	520
100	20	15	25	0.5	40	2500	80	4,912	4,260631	425
100	20	15	25	0.5	45	2500	89	5,643	4,662839	368
100	20	15	25	0.5	50	2500	100	6,6275	5,210494	301
100	20	15	25	0.5	55	2500	109	7,221	5,656065	311
100	20	15	25	0.5	60	2500	120	8,015	6,061732	248
100	20	15	25	0.5	65	2500	129	8,778	6,541485	222
100	20	15	25	0.5	70	2500	140	9,4845	6,868351	206
100	20	15	25	0.5	75	2500	149	9,7595	7,071906	231
100	20	15	25	0.5	80	2500	160	10,772	7,535143	173
100	20	15	25	0.5	85	2500	169	10,854	7,771754	190

100	20	15	25	0.5	90	2500	180	11,5535	8,062629	187
100	20	15	25	0.5	95	2500	189	12,2615	8,300716	150
100	20	25	25	0.5	15	2500	29	3,528	2,635045	332
100	20	30	25	0.5	15	2500	29	5,5605	2,972336	128
100	20	35	25	0.5	15	2500	29	7,2255	3,047338	37
100	20	40	25	0.5	15	2500	29	9,025	2,951136	11
100	20	45	25	0.5	15	2500	29	10,4595	2,756101	0
100	20	50	25	0.5	15	2500	29	11,6095	2,642534	2
100	20	55	25	0.5	15	2500	29	12,488	2,444538	0
100	20	60	25	0.5	15	2500	29	13,44	2,259393	0
100	20	65	25	0.5	15	2500	29	14,0685	2,164555	0
100	20	70	25	0.5	15	2500	29	14,6885	1,969259	0
100	20	75	25	0.5	15	2500	29	15,208	1,77764	0
100	20	80	25	0.5	15	2500	29	15,602	1,659184	0
100	20	85	25	0.5	15	2500	29	15,8715	1,528324	0
100	20	90	25	0.5	15	2500	29	16,22	1,434937	0
100	20	95	25	0.5	15	2500	29	16,446	1,348352	0
100	20	20	25	0.5	30	2500	60	6,757	4,345502	176
100	20	20	25	0.5	35	2500	69	8,02	5,126626	163
100	20	20	25	0.5	40	2500	80	9,458	5,600372	124
100	20	20	25	0.5	45	2500	89	10,571	6,269838	112
100	20	20	25	0.5	50	2500	100	11,854	6,687432	92
100	20	20	25	0.5	55	2500	109	13,029	7,172546	87
100	20	20	25	0.5	60	2500	120	14,0145	7,598597	61
100	20	20	25	0.5	65	2500	129	14,984	7,889549	66
100	20	20	25	0.5	70	2500	140	15,686	8,523368	66
100	20	20	25	0.5	75	2500	149	16,852	9,220578	64
100	20	20	25	0.5	80	2500	160	17,6455	9,56086	60
100	20	20	25	0.5	85	2500	169	18,213	9,808478	58
100	20	20	25	0.5	90	2500	180	18,9845	9,972245	61
100	20	20	25	0.5	95	2500	189	19,2185	10,42778	58
100	20	30	25	0.5	20	2500	40	8,758	3,864308	32
100	20	35	25	0.5	20	2500	40	11,008	3,874585	12
100	20	40	25	0.5	20	2500	40	13,028	3,921084	7
100	20	45	25	0.5	20	2500	40	14,8535	3,59576	0
100	20	50	25	0.5	20	2500	40	16,2975	3,551796	1
100	20	55	25	0.5	20	2500	40	17,722	3,230188	0
100	20	60	25	0.5	20	2500	40	18,922	3,008068	0
100	20	65	25	0.5	20	2500	40	19,7055	2,833924	0
100	20	70	25	0.5	20	2500	40	20,574	2,762123	0
100	20	75	25	0.5	20	2500	40	21,225	2,51334	0
100	20	80	25	0.5	20	2500	40	21,848	2,409791	0
100	20	85	25	0.5	20	2500	40	22,3195	2,170001	0
100	20	90	25	0.5	20	2500	40	22,7575	2,103769	0
100	20	95	25	0.5	20	2500	40	23,1805	1,932638	0

100	20	25	25	0.5	35	2500	69	12,423	5,8076	42
100	20	25	25	0.5	40	2500	80	14,3795	6,408093	24
100	20	25	25	0.5	45	2500	89	15,6635	6,97785	30
100	20	25	25	0.5	50	2500	100	16,968	7,578823	24
100	20	25	25	0.5	55	2500	109	18,3705	8,056658	25
100	20	25	25	0.5	60	2500	120	19,7245	8,713126	24
100	20	25	25	0.5	65	2500	129	20,754	9,227418	30
100	20	25	25	0.5	70	2500	140	22,07	9,689259	18
100	20	25	25	0.5	75	2500	149	22,8695	10,10111	22
100	20	25	25	0.5	80	2500	160	23,4265	10,5631	27
100	20	25	25	0.5	85	2500	169	24,4575	10,73442	13
100	20	25	25	0.5	90	2500	180	24,801	11,51324	26
100	20	25	25	0.5	95	2500	189	26,8015	11,84344	16
100	20	35	25	0.5	25	2500	49	13,8725	4,532137	5
100	20	40	25	0.5	25	2500	49	16,45	4,54853	0
100	20	45	25	0.5	25	2500	49	18,4325	4,442779	2
100	20	50	25	0.5	25	2500	49	20,316	4,135183	0
100	20	55	25	0.5	25	2500	49	21,7995	3,908659	0
100	20	60	25	0.5	25	2500	49	22,9805	3,884946	0
100	20	65	25	0.5	25	2500	49	24,236	3,525606	0
100	20	70	25	0.5	25	2500	49	25,2905	3,346029	0
100	20	75	25	0.5	25	2500	49	26,2	3,151736	0
100	20	80	25	0.5	25	2500	49	26,9065	2,961405	0
100	20	85	25	0.5	25	2500	49	27,532	2,792274	0
100	20	90	25	0.5	25	2500	49	28,1385	2,755769	0
100	20	95	25	0.5	25	2500	49	28,6745	2,514748	0
100	20	30	25	0.5	40	2500	80	18,3985	6,567746	5
100	20	30	25	0.5	45	2500	89	20,0395	7,506138	5
100	20	30	25	0.5	50	2500	100	22,0175	8,001763	6
100	20	30	25	0.5	55	2500	109	23,628	8,604861	7
100	20	30	25	0.5	60	2500	120	24,8335	9,141529	5
100	20	30	25	0.5	65	2500	129	25,781	9,811584	8
100	20	30	25	0.5	70	2500	140	27,2955	10,53032	6
100	20	30	25	0.5	75	2500	149	28,7275	11,15784	3
100	20	30	25	0.5	80	2500	160	30,085	11,82318	13
100	20	30	25	0.5	85	2500	169	30,178	11,65441	8
100	20	30	25	0.5	90	2500	180	31,8405	12,26349	3
100	20	30	25	0.5	95	2500	189	33,069	12,54986	2
100	20	40	25	0.5	30	2500	60	19,986	5,415669	0
100	20	45	25	0.5	30	2500	60	22,2095	5,089259	0
100	20	50	25	0.5	30	2500	60	24,1625	5,075231	0
100	20	55	25	0.5	30	2500	60	25,9515	4,86662	0
100	20	60	25	0.5	30	2500	60	27,807	4,640314	0
100	20	65	25	0.5	30	2500	60	29,1625	4,216632	0
100	20	70	25	0.5	30	2500	60	30,289	4,333459	0

100	20	75	25	0.5	30	2500	60	31,1785	4,042005	0
100	20	80	25	0.5	30	2500	60	32,2845	3,791009	0
100	20	85	25	0.5	30	2500	60	32,9015	3,687899	0
100	20	90	25	0.5	30	2500	60	33,682	3,504143	0
100	20	95	25	0.5	30	2500	60	34,45	3,296503	0
100	20	35	25	0.5	45	2500	89	23,797	7,55694	1
100	20	35	25	0.5	50	2500	100	26,4015	8,490721	3
100	20	35	25	0.5	55	2500	109	28,1385	9,09872	1
100	20	35	25	0.5	60	2500	120	30,059	9,316701	1
100	20	35	25	0.5	65	2500	129	30,698	9,996537	1
100	20	35	25	0.5	70	2500	140	32,752	10,65567	2
100	20	35	25	0.5	75	2500	149	34,0425	11,47303	4
100	20	35	25	0.5	80	2500	160	35,5065	11,89747	1
100	20	35	25	0.5	85	2500	169	36,1865	12,65305	1
100	20	35	25	0.5	90	2500	180	37,5965	13,01739	3
100	20	35	25	0.5	95	2500	189	37,714	13,38734	3
100	20	45	25	0.5	35	2500	69	25,1905	6,121678	1
100	20	50	25	0.5	35	2500	69	27,573	5,913895	0
100	20	55	25	0.5	35	2500	69	29,557	5,597179	0
100	20	60	25	0.5	35	2500	69	31,304	5,295905	1
100	20	65	25	0.5	35	2500	69	32,764	5,118144	0
100	20	70	25	0.5	35	2500	69	34,1435	4,952794	0
100	20	75	25	0.5	35	2500	69	35,581	4,679785	0
100	20	80	25	0.5	35	2500	69	36,5975	4,385785	0
100	20	85	25	0.5	35	2500	69	37,532	4,304677	0
100	20	90	25	0.5	35	2500	69	38,1825	4,336542	0
100	20	95	25	0.5	35	2500	69	39,0145	3,977461	0
100	20	40	25	0.5	50	2500	100	30,0845	8,405277	1
100	20	40	25	0.5	55	2500	109	31,9995	9,060715	0
100	20	40	25	0.5	60	2500	120	33,502	9,697836	2
100	20	40	25	0.5	65	2500	129	35,449	10,10705	1
100	20	40	25	0.5	70	2500	140	37,4915	10,8741	0
100	20	40	25	0.5	75	2500	149	38,2635	11,45411	1
100	20	40	25	0.5	80	2500	160	39,86	12,13973	0
100	20	40	25	0.5	85	2500	169	41,2585	12,68878	0
100	20	40	25	0.5	90	2500	180	41,949	13,12206	0
100	20	40	25	0.5	95	2500	189	43,068	13,46358	2
100	20	50	25	0.5	40	2500	80	30,869	6,667688	0
100	20	55	25	0.5	40	2500	80	33,018	6,526942	0
100	20	60	25	0.5	40	2500	80	35,1195	6,222586	0
100	20	65	25	0.5	40	2500	80	36,8225	6,108654	0
100	20	70	25	0.5	40	2500	80	38,494	5,864142	0
100	20	75	25	0.5	40	2500	80	40,067	5,618122	0
100	20	80	25	0.5	40	2500	80	41,072	5,402537	0
100	20	85	25	0.5	40	2500	80	42,1665	5,261808	0

100	20	90	25	0.5	40	2500	80	43,3285	4,81645	0
100	20	95	25	0.5	40	2500	80	44,1985	4,653378	0
100	20	45	25	0.5	55	2500	109	35,447	8,854117	0
100	20	45	25	0.5	60	2500	120	37,331	9,909871	0
100	20	45	25	0.5	65	2500	129	39,3265	10,18468	0
100	20	45	25	0.5	70	2500	140	41,188	11,01033	0
100	20	45	25	0.5	75	2500	149	42,9005	11,29825	0
100	20	45	25	0.5	80	2500	160	44,3335	12,62081	0
100	20	45	25	0.5	85	2500	169	45,5875	12,80075	1
100	20	45	25	0.5	90	2500	180	46,9835	13,37373	0
100	20	45	25	0.5	95	2500	189	48,3275	13,83861	0
100	20	55	25	0.5	45	2500	89	36,1265	7,182917	0
100	20	60	25	0.5	45	2500	89	38,1495	7,126047	0
100	20	65	25	0.5	45	2500	89	40,1145	6,719298	0
100	20	70	25	0.5	45	2500	89	41,6925	6,514842	0
100	20	75	25	0.5	45	2500	89	43,431	6,343135	0
100	20	80	25	0.5	45	2500	89	44,5915	6,095343	0
100	20	85	25	0.5	45	2500	89	45,952	5,934417	0
100	20	90	25	0.5	45	2500	89	47,013	5,707199	0
100	20	95	25	0.5	45	2500	89	48,142	5,53933	0
100	20	50	25	0.5	60	2500	120	41,345	9,686273	0
100	20	50	25	0.5	65	2500	129	43,0085	10,80761	1
100	20	50	25	0.5	70	2500	140	45,6135	10,91547	0
100	20	50	25	0.5	75	2500	149	47,08	11,62824	0
100	20	50	25	0.5	80	2500	160	48,033	12,577	0
100	20	50	25	0.5	85	2500	169	49,6505	13,03834	0
100	20	50	25	0.5	90	2500	180	51,139	13,41625	0
100	20	50	25	0.5	95	2500	189	52,1995	13,99309	1
100	20	60	25	0.5	50	2500	100	41,255	7,757839	0
100	20	65	25	0.5	50	2500	100	43,4705	7,753979	0
100	20	70	25	0.5	50	2500	100	45,2765	7,541186	0
100	20	75	25	0.5	50	2500	100	46,858	7,268029	0
100	20	80	25	0.5	50	2500	100	48,7955	6,629529	0
100	20	85	25	0.5	50	2500	100	49,715	7,015724	0
100	20	90	25	0.5	50	2500	100	51,2205	6,732871	0
100	20	95	25	0.5	50	2500	100	52,2445	6,458218	0
100	20	55	25	0.5	65	2500	129	45,9445	10,42645	0
100	20	55	25	0.5	70	2500	140	48,3655	10,85093	0
100	20	55	25	0.5	75	2500	149	49,831	11,30147	0
100	20	55	25	0.5	80	2500	160	51,8235	12,53654	0
100	20	55	25	0.5	85	2500	169	54,0295	12,87845	0
100	20	55	25	0.5	90	2500	180	55,4125	13,22134	0
100	20	55	25	0.5	95	2500	189	55,9415	13,7468	0
100	20	65	25	0.5	55	2500	109	46,498	8,402755	0
100	20	70	25	0.5	55	2500	109	47,935	8,30387	0

100	20	75	25	0.5	55	2500	109	50,1825	8,060563	0
100	20	80	25	0.5	55	2500	109	51,819	7,580763	0
100	20	85	25	0.5	55	2500	109	53,138	7,649916	0
100	20	90	25	0.5	55	2500	109	54,6215	7,16784	0
100	20	95	25	0.5	55	2500	109	55,6495	7,011222	0
100	20	60	25	0.5	70	2500	140	51,684	10,54361	0
100	20	60	25	0.5	75	2500	149	52,8925	11,43724	0
100	45	60	25	0.5	80	2500	160	55,4745	12,07417	0
100	45	60	25	0.5	85	2500	169	56,7255	12,36987	0
100	45	60	25	0.5	90	2500	180	58,0085	13,40025	0
100	45	60	25	0.5	95	2500	189	59,756	14,07992	0
100	45	70	25	0.5	60	2500	120	51,187	9,068962	0
100	45	75	25	0.5	60	2500	120	53,235	8,745967	0
100	45	80	25	0.5	60	2500	120	54,9495	8,492538	0
100	45	85	25	0.5	60	2500	120	56,826	8,161498	0
100	45	90	25	0.5	60	2500	120	58,189	8,073009	0
100	45	95	25	0.5	60	2500	120	59,5625	7,697615	0
100	45	65	25	0.5	75	2500	149	55,739	11,22282	0
100	45	65	25	0.5	80	2500	160	58,2005	11,97603	0
100	45	65	25	0.5	85	2500	169	59,967	12,98197	0
100	45	65	25	0.5	90	2500	180	61,215	13,33818	0
100	45	65	25	0.5	95	2500	189	62,778	14,21354	0
100	45	75	25	0.5	65	2500	129	55,8765	9,712223	0
100	45	80	25	0.5	65	2500	129	57,6525	9,357497	0
100	45	85	25	0.5	65	2500	129	59,633	9,117288	0
100	45	90	25	0.5	65	2500	129	61,0265	9,028491	0
100	45	95	25	0.5	65	2500	129	62,5385	8,576838	0
100	45	70	25	0.5	80	2500	160	60,941	12,16771	0
100	45	70	25	0.5	85	2500	169	62,3685	12,57844	0
100	45	70	25	0.5	90	2500	180	64,4425	13,14521	0
100	45	70	25	0.5	95	2500	189	65,914	14,10899	0
100	20	80	25	0.5	70	2500	140	60,372	10,0495	0
100	20	85	25	0.5	70	2500	140	62,3345	9,859707	0
100	20	90	25	0.5	70	2500	140	64,165	9,670584	0
100	20	95	25	0.5	70	2500	140	65,6185	9,462343	0
100	20	75	25	0.5	85	2500	169	64,6685	12,15769	0
100	20	75	25	0.5	90	2500	180	67,27	12,99924	0
100	20	75	25	0.5	95	2500	189	68,835	13,51444	0
100	20	85	25	0.5	75	2500	149	64,984	10,7153	0
100	20	90	25	0.5	75	2500	149	66,5785	10,85851	0
100	20	95	25	0.5	75	2500	149	68,245	9,98231	0
100	20	80	25	0.5	90	2500	180	69,3405	12,91468	0
100	20	80	25	0.5	95	2500	189	70,962	13,42653	0
100	20	90	25	0.5	80	2500	160	68,979	10,99311	0
100	20	95	25	0.5	80	2500	160	71,08	11,27243	0

100	20	85	25	0.5	95	2500	189	73,2425	13,52781	0
100	20	95	25	0.5	85	2500	169	73,106	11,76953	0

As células com coloração laranja são o número de simulações de um conjunto de parâmetros em que número de caramujos infectados foi igual a zero. As células verdes em que a média de infecção foi inferior a um. E as células em amarelo são as que a média de infecção foi igual a zero.



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pró-Reitoria de Graduação
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar
Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564
E-mail: prograd@pucrs.br
Site: www.pucrs.br