

**FLORENCE MARA ROSA**

***Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835) da  
linhagem do Taim, RS: Estudos de campo e  
laboratorial visando o controle da transmissão da  
esquistossomose**

**Universidade Federal de Minas Gerais**

**2008**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**FLORENCE MARA ROSA**

***Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835) da  
linhagem do Taim, RS: Estudos de campo e  
laboratorial visando o controle da transmissão da  
esquistossomose**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Parasitologia.

Orientador: Dra. Deborah A. Negrão-Côrrea

Co-orientador: Dr. Paulo Marcos Zech Coelho

**Universidade Federal de Minas Gerais**

**2008**

ESTE TRABALHO FOI REALIZADO NOS LABORATÓRIOS DE ESQUISTOSSOMOSE, DO DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA DO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS/UFMG. LABORATÓRIO DE ESQUISTOSSOMOSE E LABORATÓRIO DE HELMINTOLOGIA MÉDICA E MALACOLOGIA DO CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU/FIOCRUZ E NA CHÁCARA SANTA INÊS MUNICÍPIO DE BANANAL-SP.

**INSTITUIÇÕES QUE CONTRIBUÍRAM PARA A REALIZAÇÃO  
DESTE TRABALHO:**

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- CNPq

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas- Gerais-FAPEMIG

PRONEX

Dedico essa tese a Deus, a minha família, aos meus orientadores e a todos que ajudaram na execução deste grande trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus pela superação dos inúmeros obstáculos.

Ao Prof. Paulo Marcos Zech Coelho, pelo apoio constante, braço amigo de todas as etapas deste trabalho e uma das pessoas mais extraordinárias que eu já conheci.

A Dr<sup>a</sup>. Deborah Negrão-Corrêa pela orientação e pelos incentivos constantes.

A universidade Federal de Minas Gerais pela minha qualificação profissional.

Ao programa de Pós-graduação em Parasitologia-UFMG e seus professores na pessoa do Dr. Pedro Marcos Linardi, pelo conhecimento adquirido durante a minha formação.

Ao colaborador, Dr. Horácio Manuel Santana Teles, pesquisador da Superintendência de Controle de Endemias do estado de São Paulo, pelos grandes incentivos e ensinamentos.

Ao Dr. Engels Maciel e Dr<sup>a</sup>. Maria Lúcia "Minuca" pela importante contribuição para a execução deste trabalho e pela amizade.

Ao Querido Técnico da SUCEN de Bananal João Batista dos Santos pela amizade e dedicação durante todos estes anos.

A Dr<sup>a</sup>. Roberta Caldeira por ter colaborado na identificação morfológica dos moluscos e principalmente pelos conhecimentos que foram repassados.

Ao Dr. Omar pelo apoio dado no início do trabalho.

A Prof.<sup>a</sup> Norma de Melo, as colegas Rosângela e Soraia do Departamento de Parasitologia por terem possibilitado o desenvolvimento de parte deste trabalho.

A Dr.<sup>a</sup> Ana Lúcia Godard pela sua participação em algumas fases do trabalho.

Ao Dr. Vasco de Azevedo, Dr. Anderson e os estudantes do Laboratório de genética Celular e Molecular por serem extremamente prestativos.

Ao estudante de iniciação científica Horácio Antônio Rodrigues por me ajudar durante a contagem de desovas e ovos de *B. tenagophila*.

Ao colega Jefferson Bernades por manter a criação de *B. tenagophila* do Taim.

Aos amigos do Laboratório de Esquistossomose: Selma, José Carlos, Sr. Alberto; Airton, Wanderlany, Atenágoras, Jefferson, Zenir, José Thiago, Cíntia, Dayse, Fernanda, Jailza, Paula, Karina, Adriana, Emília, Michelle, Ana, Terezinha, Maria, Prof. Alan Lane de Melo, Gustavo, Victor, Hudson e Sandro pelo agradável convívio.

A Ana Lúcia de Bananal pelo carinho.

As amigas Cíntia, Selma e Dayse pela ajuda e compreensão durante os momentos difíceis.

A secretária da Pós-graduação Sumara pelas palavras amigas nos momentos de crise.

A Dona Vera de Paula, Jussara e Aúreo do Laboratório de Esquistossomose do Centro de Pesquisa René Rachou pela ajuda prestada durante inúmeras fases do trabalho.

Aos Funcionários da SUCEN de Caraguatuba: João Carlos e ao José pelo apoio dado sempre que necessário.

Aos colegas do Laboratório de Helmintologia Médica e Malacologia: Cristiane Gôuvea, Dr.<sup>a</sup> Liana,, Larissa, Tatiana, Ricardo, Ronaldo, Fernanda, Sandra, Simone e Cristiano pelos bons momentos que passamos juntos.

As amigas de longa data: Simone, Liana, Alessandra, Mauren, Raquel, Sandra e Tássani.

A minha querida família, pelas inúmeras torcidas.

"Há momentos em que precisamos sonhar, pois assim as coisas acontecem"  
Dr. Oscar Niemeyer

<b>SUMÁRIO</b>	
LISTA DE FIGURAS .....	XI
LISTADE TABELAS .....	XIII
RESUMO .....	XIV
ABSTRACT .....	XVII
<b>1- INTRODUÇÃO</b>	
1.1- A esquistossomose no Brasil e no mundo.....	20
1.2-Ciclo.....	22
1.3-Distribuição geográfica dos principais hospedeiros intermediários.....	25
1.4-Alguns aspectos biológicos do gênero <i>Biomphalaria</i> .....	28
1.5-Aspectos genéticos e do sistema interno de defesa de <i>B. glabrata</i> .....	31
1.6 Aspectos envolvidos na suscetibilidade de <i>B. tenagophila</i> .....	37
1.7 Controle biológico da transmissão da esquistossomose .....	39
<b>2- OBJETIVOS</b>	
2.1- Objetivo Geral .....	45
2.2- Objetivo específico .....	45
<b>Parte 1- Participação do sistema interno de defesa no mecanismo de destruição dos esporocistos de <i>S. mansoni</i> e a transmissão do marcador molecular de 350 pb nas progênes F1 e F2. ....</b>	
<b>46</b>	
<b>3- MATERIAL E MÉTODOS</b>	
3.1 Caramujos .....	47
3.2 Parasitos .....	47
3.3 Cruzamentos .....	48
3.4 Identificação do marcador molecular de 350 pb nas progênes F1 e F2.....	49
3.4.1Extração de DNA .....	49
3.4.2 Dosagem do DNA .....	50
3.4.3 Protocolo da PCR (Polymerase Chain Reaction).....	51
3.4.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida 6% .....	52
3.4.5 Protocolo da técnica PCR_RFLP ((Restriction Fragments Lenght Polimorphisms) .....	52
3.5 Interação <i>in vitro</i> entre esporocistos de <i>S. mansoni</i> , hemócitos e hemolinfa de <i>B. teanagophila</i> das linhagens Taim, Joinville e seus descendentes F1 e F2.....	53
3.5.1 Transformação de miracídios de <i>S. mansoni</i> em esporocistos <i>in vitro</i> .....	53
3.5.2 Obtenção de hemolinfa e hemócitos dos caramujos parentais e seus descendentes .....	54
3.5.3 Mortalidade de esporocistos <i>in vitro</i> .....	55
3.5.4 Análise estatística .....	56
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>57</b>
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>63</b>

<b>Parte 2- Transmissão do caráter resistência da população <i>B. tenagophila</i> do Taim quando mantido em diferentes proporções com a população suscetível <i>B. tenagophila</i> de Joinville, submetidos ou não à pressão do parasito .....</b>	<b>68</b>
<b>6- MATERIAL E MÉTODOS</b>	
6.1 Caramujos .....	69
6.2 Parasitos .....	69
6.3 Infecção de caramujos .....	69
6.4 Avaliação da infecção .....	69
6.5 Montagem dos grupos experimentais .....	70
6.6 Taxa de sobrevivência dos adultos .....	72
6.7 Parâmetros de fecundidade e análise estatística .....	72
6.8 Teste de suscetibilidade das progênes F1, F2 e F3 .....	73
<b>7- RESULTADOS</b>	
7.1 Proporção entre albinos e pigmentados .....	74
7.2 Efeito da exposição ao <i>S. mansoni</i> nas populações suscetíveis e resistentes de <i>B. tenagophila</i> quando isoladas.....	75
7.3 Efeito da exposição ao <i>S. mansoni</i> nas populações mistas de <i>B. tenagophila</i> de linhagens suscetíveis e resistentes .....	79
7.4 Efeito da infecção por <i>S. mansoni</i> sobre os parâmetros de fecundidade dos Caramujos dos diferentes grupos experimentais .....	84
7.5 Teste de suscetibilidade dos indivíduos das progênes F1, F2 e F3 .....	90
<b>8- DISCUSSÃO</b>	<b>92</b>
<b>PARTE 3- Introdução da linhagem resistente <i>B. tenagophila</i> do Taim em focos de transmissão da esquistossomose situados no município de Bananal .....</b>	<b>96</b>
<b>9- MATERIAL E MÉTODOS</b>	
9.1 Área de estudo .....	97
9.2 Levantamento malacológico .....	99
9.3 Criação em larga escala de <i>B. tenagophila</i> do Taim em larga escala.....	101
9.3.1 Local e montagem dos tanques.....	101
9.3.2 Criação e alimentação.....	103
9.4 Introdução no campo .....	104
9.5 Monitoramento das áreas sob intervenção .....	105
9.5.1-Exame parasitológico .....	106
9.5.2 Teste molecular .....	106
9.5.3- Teste de suscetibilidade.....	107
<b>10- RESULTADOS</b> .....	<b>108</b>
<b>11- DISCUSSÃO</b> .....	<b>117</b>
<b>12- CONCLUSÃO</b> .....	<b>123</b>
<b>REFERÊNCIA</b> .....	<b>125</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>142</b>

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Cruzamento entre exemplares de <i>B. tenagophila</i> do Taim (pigmentado) e <i>B. tenagophila</i> de Joinville (albino) .....	48
FIGURA 2- Perfis de restrição do fragmento de 1300 pb de <i>B. tenagophila</i> , após A digestão com a enzima <i>Ddel</i> , em gel de poliacrilamida 6% corado pela prata .....	58
FIGURA 3- Perfis de restrição do fragmento de 1300 pb de <i>B. tenagophila</i> , após a digestão com a enzima <i>Ddel</i> , em gel de poliacrilamida 6% corado pela prata .....	59
FIGURA 4- Taxa de sobrevivência dos esporocistos de <i>Schistosoma mansoni</i> Cultivados na presença de hemócitos e/ ou fatores solúveis da hemolinfa De <i>B. tenagophila</i> do Taim, <i>B. tenagophila</i> de Joinville, F1 e F2 .....	62
FIGURA 5- Curvas de sobrevivência da população de <i>B. tenagophila</i> do Taim (R) e seus descendentes mantidos durante 10 semanas com exposição frequente à miracidios de <i>S. mansoni</i> (infectado) ou não expostos ao parasito (não infectado) .....	77
FIGURA 6- Curvas de sobrevivência da população de <i>B. tenagophila</i> de Joinville (S) e seus descendentes mantidos durante 10 semanas com exposição frequente à miracidios de <i>S. mansoni</i> (infectado) ou não expostos ao parasito (não infectado) .....	78
FIGURA 7- Curvas de sobrevivência dos 25 caramujos <i>B. tenagophila</i> de Joinville (S) e dos 25 <i>B. tenagophila</i> Taim (R) e seus descendentes mantidos associados durante 10 semanas, com exposição frequente à miracidios de <i>S. mansoni</i> (infectado) ou não expostos ao parasito (não infectado) .....	80
FIGURA 8- Curvas de sobrevivência dos 40 caramujos <i>B. tenagophila</i> Joinville (S) e dos 10 <i>B. tenagophila</i> Taim (R) e seus descendentes mantidos associados durante 10 semanas, com exposição frequente à miracidios de <i>S. mansoni</i> (infectado) ou não expostos ao parasito (não infectados) .....	82

FIGURA 9- Curvas de sobrevivência dos 10 caramujos <i>B. tenagophila</i> Joinville (S) e dos 40 <i>B. tenagophila</i> Taim (R) e seus descendentes mantidos associados durante 10 semanas, com exposição frequente à miracidios de <i>S. mansoni</i> (infectado) ou não expostos ao parasito (não infectados) .....	83
FIGURA 10- Parâmetros de fecundidade (ovos/desova e ovos/caramujo) produzidos durante o período de 10 semanas pelas populações resistente (R) e suscetível (S) de <i>B. tenagophila</i> quando mantidas isoladas submetidas ou não à pressão pelo <i>S. mansoni</i> .....	88
FIGURA 11- Acessos rodoviários de Bananal, São Paulo, Brasil .....	97
FIGURA 12- Panorama da área urbana de Bananal, São Paulo .....	98
FIGURA 13- Levantamento malacológico das áreas de transmissão do município de Bananal-SP .....	100
FIGURA 14- Tanque de criação de <i>B. tenagophila</i> do Taim .....	102
FIGURA 15- Sistema de aquecimento utilizado no inverno .....	102
FIGURA 16- Exemplares de <i>B. tenagophila</i> do Taim com suas conchas marcadas com fio de nylon.....	105
FIGURA 17- Croqui da área urbana da Bananal com detalhes da drenagem natural .....	109
FIGURA 18- Perfis de restrição de <i>B. tenagophila</i> , após a digestão com a enzima <i>Ddel</i> , em gel de poliacrilamida 6% corado pela prata. ....	114

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1-</b> Desenho esquemático dos grupos parentais utilizados no experimento, submetidos ou não à pressão do parasito .....	71
<b>TABELA 2-</b> Percentagem entre caramujos albinos e pigmentados obtidos do cruzamento entre <i>B. tenagophila</i> resistente(pigmentada) e suscetível albina .....	74
<b>TABELA 3-</b> Média do número de ovos/desova e ovos por caramujo produzidos pelos grupos parentais e os descendentes F1 e F2 durante o período de 10 semanas, quando expostos ou não ao <i>S. mansoni</i> .....	85
<b>TABELA 4-</b> Média do número de ovos/desova e ovos por caramujo produzidos pelos grupos parentais durante o período de (1-4) e de (5-8) semanas, quando expostos ou não ao <i>S. mansoni</i> .....	86
<b>TABELA 5-</b> Rendimento final da eclosão após 30 dias, tomando como referência o número de ovos iniciais de cada grupo parental e o número de descendentes F1 sobreviventes .....	89
<b>TABELA 6 -</b> Suscetibilidade dos indivíduos das progênie F1,F2 e F3 obtidos de cruzamento entre <i>B. tenagophila</i> Taim X <i>B. tenagophila</i> de Joinville, quando infectados individualmente com 30 miracídios da cepa LE de <i>S. mansoni</i> . .....	91
<b>TABELA 7-</b> Taxa de infecção natural de <i>S. mansoni</i> dos moluscos coletados em coleções hídricas de Município de Bananal em Fevereiro de 2005 (antes das introduções) .....	108
<b>TABELA 8-</b> Avaliação da densidade populacional de <i>B. tenagophila</i> do Taim e habitats onde ocorreram a introdução, Agosto de 2007 .....	111
<b>TABELA 9-</b> Taxa de suscetibilidade à cepa SJ de <i>S. mansoni</i> dos moluscos coletados no município de Bananal antes e após as intervenções. Caramujos foram examinados durante o período de 30-90 dias de infecção.....	116

## RESUMO

A esquistossomose mansoni ainda é um problema de saúde pública no Brasil, pois acomete milhões de pessoas. Os programas de controle baseados principalmente na quimioterapia foram capazes de diminuir a morbidade e mortalidade, mas não conseguiram interromper a transmissão da doença e nem a ocorrência de novos focos. Assim torna-se justificável e imperativo a busca de novas alternativas que possam resultar em novas estratégias para o controle da doença. O principal objetivo deste trabalho foi testar o modelo de controle biológico da transmissão da esquistossomose, mediante a introdução de *Biomphalaria tenagophila* do Taim em áreas onde a transmissão da doença é mantida por *B. tenagophila*. A linhagem do Taim coletada na Estação Ecológica do Taim, Rio Grande do Sul-Brasil é totalmente resistente ao *Schistosoma mansoni*. Vários trabalhos publicados têm demonstrado que esta resistência é devido ao sistema inato de defesa. Cruzamentos entre *B. teangophila* do Taim e *B. tenagophila* de Joinville (linhagem suscetível) mostraram que o caráter da resistência ao *S. mansoni* é dominante. No presente estudo, foi identificado por meio da técnica PCR\_RFLP que o fragmento de 350pb, típico da linhagem do Taim, tem caráter dominante. Este fragmento foi encontrado em 100% dos indivíduos da progênie F1 e 75% dos indivíduos F2. O marcador molecular possui caráter dominante e apesar de não estar relacionado com a resistência, foi de grande importância para monitoramento da inserção da herança genética da linhagem do Taim após as introduções. Neste trabalho experimental foi demonstrado a participação do hemócitos mais os fatores solúveis da hemolinfa das progênies F1 e F2, obtidas do cruzamento entre linhagens resistentes e suscetíveis de *B. tenagophila*, na destruição dos esporocistos de *S. mansoni* *in vitro*. Em condições de laboratório foram avaliados, fecundidade, taxa de sobrevivência e a transmissão do caráter da resistência de uma

população mista de *B. tenagophila* formada por indivíduos resistentes e suscetíveis mantidos em diferentes proporções submetidos ou não a pressão do *S. mansoni*, Neste tipo de estudo foi demonstrado que o *S. mansoni* foi um fator de pressão seletiva negativa para as populações suscetíveis. Por outro lado, a população resistente não foi afetada quando infectada pelo *S. mansoni* e *B. tenagophila* do Taim foi mais fecunda do que a linhagem suscetível *B. tenagophila* Joinville. As taxas de sobrevivência da população resistente, independente da infecção, foram reduzidas apenas quando mantida junto com uma maioria de caramujos suscetíveis. Contudo, mesmo nos grupos em que linhagem *B. tenagophila* do Taim estava em desvantagem a transmissão do caráter resistência ocorreu de forma eficiente, pois grande número dos indivíduos das progênies F1, F2 e F3 foram resistentes ao *S. mansoni*. Finalmente, a padronização de uma técnica para cultivo em massa da linhagem *B. tenagophila* do Taim foi essencial para testar o modelo de controle biológico no campo. A área selecionada foi o município de Bananal do estado de São Paulo e a linhagem resistente foi introduzida nos córregos Lava Pés, Chácara Santa Inês e São José do Retiro. Os caramujos que foram introduzidos nestes córregos tiveram suas conchas marcadas e isto nos permitiu estimar a densidade populacional da linhagem local e introduzida. Após 15 dias, a densidade populacional destas áreas foi estimada, sendo que 67% dos caramujos coletados no Córrego Lava Pés e 70% dos indivíduos coletados no Córrego da Chácara Santa Inês eram *B. tenagophila* do Taim. No Córrego São José do Retiro apenas 4% dos caramujos eram da linhagem resistente. Para avaliar se o material genético da linhagem resistente estava sendo transmitido aos caramujos locais, após 4 meses foram coletados apenas os caramujos que possuíam menos que 5mm de diâmetro (filhotes). Estes moluscos foram submetidos a técnica PCR\_RFLP para detectar a presença do marcador de 350pb (marcador molecular típico da linhagem do Taim). No Córrego Lava Pés, 43% dos indivíduos analisados apresentaram o

fragmento de 350pb e no Córrego da Chácara Santa Inês, 36%. Estes resultados indicam que nestas duas áreas a linhagem resistente foi capaz de se estabelecer e transmitir o seu material genético aos caramujos locais. No córrego São José do Retiro, local onde o número de caramujos resistente era inferior a população local, somente 3% dos caramujos analisados apresentaram o marcador de 350 pb. Estes resultados nos permitem inferir que há uma relação direta entre a proporção de caramujos da linhagem do Taim introduzida com a população local e com a proporção de descendentes com o patrimônio genético da linhagem resistente. Estes dados reforçam a necessidade do uso do moluscicida no ambiente com alta densidade populacional de caramujos locais, antes da introdução. Os testes de suscetibilidade realizados com a cepa SJ de *S. mansoni* nos caramujos coletados antes e após as intervenções, ainda não nos permitiu avaliar o efeito da introdução da linhagem resistente sobre a transmissão do parasito. Embora, seja necessário realizar mais experimentos no campo com o modelo ora proposto, os resultados preliminares apontam para o possível uso da metodologia presente para controlar a transmissão da esquistossomose em áreas onde *B. tenagophila* é a espécie transmissora.

## ABSTRACT

The schistosomiasis still is a public health problem in Brazil, it affects millions of people. The programs of control based primarily on chemotherapy were able to reduce the mortality and morbidity, but did not interrupt transmission, nor avoided the occurrence of new foci. Thus it becomes imperative and justified the search for new alternatives that may lead to new strategies for disease control. The main objective of this work was to test a biological control model of schistosomiasis transmission, using the introduction of *Biomphalaria tenagophila* from Taim, in areas where transmission of diseases is maintained by *B. tenagophila*. The Taim lineage collected at the Ecological Station of Taim, Rio Grande do Sul, Brazil is totally resistant to *S. mansoni*. Several published works have shown that this resistance is due to the innate defence system. Crossbreedings between *B. tenagophila* of Taim and *B. tenagophila* of Joinville (susceptible lineage) showed that the character of resistance to *S. mansoni* is dominant. In the present study, we identified by means of the PCR-RFLP technique that the 350 bp fragment, which is typical of *B. tenagophila* Taim, has also a dominant character. This fragment was found to be present in 100% of the specimens from progeny F1, and in 75% of the individuals F2. This molecular marker is not related to resistance, but it was of great importance for the monitoring connected with the insertion of the genetic patrimony of Taim lineage after the introductions. In this experimental work we showed the participation of hemocytes and soluble components presents in hemolymph of the F1 and F2 progeny, obtained from crossbreeding between resistant and susceptible strains of *B. tenagophila*, in the destruction sporocysts *in vitro*. In the laboratory, the fecundity, survival rate, and transmission of the resistance character of a mixed *B. tenagophila* population constituted by resistant and susceptible individuals, maintained with different proportions, and submitted or not to *S.*

*mansoni* pressure, were also evaluated. In this kind of study, it was demonstrated that *S. mansoni* was a factor of negative selective pressure for the susceptible populations. *B. tenagophila* Taim was more procreative than the susceptible lineage of *B. tenagophila* Joinville. The survival rates related to the resistant population, independently of infection, were only reduced when kept together with the majority of susceptible snails. However, even in the groups where *B. tenagophila* Taim was in disadvantage, the transmission of the resistance character occurred in an effective manner, since a high number of individuals from progenies F1, F2 and F3 were resistant to *S. mansoni*. Finally, the standardization of an efficient technique for breeding of *B. tenagophila* Taim, in mass scale, was the key to test the model of biological control in the field. The area selected was Bananal the municipality of São Paulo state and the resistant strain was introduced in the brooks “Lava Pés”, “Chácara Santa Inês” and “São José do Retiro”. Before the introduction, the resistant snails had marked their shells and this allowed us to estimate the population density of lineage local and introduced. After 15 days, the population density of these areas was estimated, 67% of snails collected in the brook “Lava Pés” and 70% of individuals in the brook of “Chacara Santa Inês” were *B. tenagophila* do Taim. In the brook “São José do Retiro” only 4% of the snails collected were of Taim lineage. After 4 months, snails (with a diameter less than 5mm) were captured to assess whether the genetic material of resistant strain was being transmitted to local snails. These snails were submitted PCR\_RFLP to detect the presence of the marker 350pb (typical molecular marker of the Taim strain). In the brook “Lava Pés”, 43% of individuals examined showed the fragment of 350pb and in the brook of “Chacara Santa Inês, 36%. These results indicate that these two areas the resistant strain was able to establish and transmit its genetic material to local snails. In the brook “São José do Retiro”, where the number of resistant snails was less than the local population, only 3% of snails examined showed the marker of 350 bp.

These results allow us to infer that there is a direct relationship between the proportion of the introduced Taim snails (in relation to the local population) with the proportion of offspring with the genetic patrimony of the introduced lineage. Further, these results strengthen the need for using of molluscicide in aquatic environment with high local population densities, before the introduction. The susceptibility tests performed with the SJ strain of *S. mansoni* in snails collected before and after the interventions, not yet allowed us to evaluate the effect of the introduction of resistant strain on the transmission of the parasite. Although there is need for carrying out more experiments in the field with the proposed model, the preliminary results point to a possible use of the present methodology for the control schistosomiasis transmission in areas where *B. tenagophila* is the transmitter species

## INTRODUÇÃO

### 1.1- A ESQUISTOSSOMOSE NO MUNDO E NO BRASIL

A esquistossomose é uma doença que tem como agentes etiológicos espécies de trematódeos do gênero *Schistosoma* Weiland, 1858. Cerca de 200 milhões de pessoas estão infectadas com, pelo menos, uma das cinco principais espécies que parasitam o homem: *Schistosoma haematobium* (Bilharz, 1852), *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, *Schistosoma japonicum* Katsurada, 1904, *Schistosoma intercalatum* Fisher, 1934 e *Schistosoma mekongi* Voge, Brikener & Bruce 1978. Depois da malária, a esquistossomose é a doença parasitária de maior morbidade no cenário mundial, apresentando prevalência elevada na África, América Latina, Oriente Médio, Ásia e Caribe (WHO, 2002).

Nas Américas, várias espécies de *Schistosoma* foram introduzidas com os escravos africanos, imigrantes orientais e asiáticos, mas apenas a espécie *S. mansoni* se instalou por encontrar hospedeiros intermediários adequados, os moluscos do gênero *Biomphalaria* Preston, 1910, como também condições ambientais semelhantes às das regiões de origem (LUTZ, 1919).

No Brasil, estima-se que há cerca de 6 a 7 milhões de pessoas parasitadas pelo *S. mansoni* e 25 milhões de indivíduos estão expostos ao risco de infecção (KATZ & PEIXOTO, 2000), entretanto estes números são controversos. A esquistossomose no país é uma doença de grande importância em saúde pública, tanto pela extensão da área endêmica, como pelo fato de atingir principalmente a população mais carente que, por conseqüência, já é fragilizada por

outras patologias decorrentes da falta de saneamento básico, educação e saúde e alimentação adequada.

Em 1970, surgiram duas drogas com ação anti-esquistossomicida, a oxamniquina e o praziquantel, que são administradas em doses únicas, apresentam altas taxas de cura e baixa toxicidade. Estas drogas foram consideradas um grande avanço em termos de tratamento, sendo utilizadas em larga escala nos programas de controle da esquistossomose. Os programas de controle baseados principalmente na quimioterapia foram capazes de diminuir a morbidade e a frequência das formas hepato-esplênicas, mas não conseguiram extinguir os focos já existentes e nem evitar a ocorrência de novos focos de transmissão da doença pelo território nacional. A avaliação realizada pelo Ministério da Saúde a respeito da eficácia dos programas de controle da esquistossomose aplicados no Brasil durante o período de 1977 a 2002, demonstrou que houve redução na prevalência da esquistossomose no país, porém esta diminuição não foi acentuada para todos os estados e a doença encontra-se em franca expansão geográfica (COURA & AMARAL, 2004).

Os primeiros casos autóctones de esquistossomose registrados no estado de São Paulo foram detectados em 1923, na Baixada Santista (ARANTES, 1924). A esquistossomose mansoni foi introduzida, graças a migração de indivíduos originários das áreas endêmicas do nordeste, principalmente da Bahia, Pernambuco, Alagoas e Sergipe assim como da porção setentrional do estado de Minas (BARBOSA, 1970). Esta corrente migratória se intensificou com o surto de industrialização verificado a partir do final da década de 1940, justamente quando a esquistossomose passa a ser reconhecida como problema de saúde pública no estado.

No estado de São Paulo foram notificados 101.846 casos de esquistossomose durante o período de 1990 a 2002, uma média de 7834 casos por ano (SOUZA ET AL., 2007). Atualmente, existem focos da esquistossomose em diversos municípios dos vales dos rios

Ribeira de Iguapé e Paraíba do Sul, do Litoral Paulista e das regiões metropolitanas de Campinas e da Grande São Paulo (SUCEN, 1995; GLASSER, 1995., TELES ET AL., 2003, TELES, 2005)

## 1.2- CICLO

O trematódeo *S. mansoni* possui um ciclo de vida complexo que envolve dois hospedeiros. O hospedeiro intermediário, caramujo do gênero *Biomphalaria* onde o parasito se reproduz assexuadamente, e o hospedeiro definitivo mamíferos dentre esses principalmente o homem, onde o parasito se reproduz sexuadamente. A evolução do *S. mansoni* no hospedeiro definitivo se inicia com a penetração ativa das formas infectantes, cercárias, através da pele e mucosa do hospedeiro. Este processo de penetração pode levar de 5 a 15 minutos. Durante a penetração, as cercárias perdem a cauda e sofrem transformações estruturais e fisiológicas dando origem aos esquistossômulos (GORDON & GRIFFITHS, 1951). Os esquistossômulos, localizados na pele do hospedeiro, migram em direção aos vasos sanguíneos e, passivamente através da circulação sanguínea, atingem os pulmões. Dos pulmões os esquistossômulos chegam ao fígado, através da circulação sanguínea e migração transtecidual, completam seu desenvolvimento atingindo a maturidade cerca de 28 dias após a penetração. Os vermes adultos acasalados migram para as veias mesentéricas inferiores e as fêmeas iniciam a postura de ovos em torno dos 35 dias após a infecção.

As fêmeas de *S. mansoni* produzem cerca de 400 ovos por dia, sendo que aproximadamente 50% destes ovos ganham a luz intestinal e saem nas fezes (VALADARES ET AL., 1981). Outra parte fica retida no tecido hepático e paredes do intestino, estimulando

reações inflamatórias granulomatosas, sendo estas as reações fundamentais na patogenia da esquistossomose mansoni (BOROS & WARREN, 1970). Os ovos maduros de *S. mansoni* eliminados nas fezes do hospedeiro contêm embriões ciliados, denominados miracídios que, ao contato com a água, eclodem e nadam ativamente até encontrarem um molusco do gênero *Biomphalaria* nos quais penetram. CHERNIN (1970, 1974) demonstrou que os moluscos produzem substâncias que estimulam a movimentação e a concentração de miracídios na proximidade do caramujo, aumentando a eficiência do processo de penetração. Entretanto, essas substâncias não promovem uma atração seletiva do miracídio em relação ao caramujo *Biomphalaria*, pois estes miracídios excitados tentam penetrar em moluscos de outros gêneros, ou mesmo, em substrato gelatinoso (CHERNIN, 1974). Outro fator que influencia fortemente a penetração dos miracídios no molusco é a temperatura. MALDONADO & ACOSTA-MATIENZO (1947) mostraram que a redução de 1° C na temperatura (26° C para 25° C) produz uma redução na taxa de infecção dos moluscos de 80% para 40%. O miracídio de *S. mansoni* pode penetrar por qualquer ponto das partes expostas do caramujo, porém, a base dos tentáculos e o pé são os locais mais utilizados (COELHO, 1957). O contato do miracídio com o tegumento do molusco ocorre inicialmente através do terebratorium, órgão localizado na extremidade anterior da larva, que ao contato com o molusco assume a forma de ventosa. Simultaneamente, o conteúdo das glândulas de adesão, localizadas lateralmente ao terebratorium é excretado. A ação combinada das enzimas digestivas das glândulas de penetração e dos movimentos contráteis e rotatórios intensos permitem a penetração da larva através do epitélio do molusco e assim estabelecendo-se no tecido subcutâneo do hospedeiro, (COELHO, 1995). Durante a penetração no caramujo os miracídios liberam o conteúdo das glândulas de adesão e penetração, e perdem suas placas ciliares. Neste processo outras estruturas como a musculatura subepitelial e o sistema nervoso, sofrem alterações. Após 72 h

da penetração, com a multiplicação de células germinativas, a larva dobra de tamanho e é denominada esporocisto primário (FAUST & HOFFMANN, 1934; OLIVER & MAO, 1949). Na segunda semana de infecção, já se pode observar alterações nas estruturas internas do esporocisto primário, suas células germinativas encontram-se em intensa diferenciação. Em condições ideais de temperatura (entre 25 e 28 ° C) as células germinativas do esporocisto primário originam os esporocistos secundários, a partir do 14º dia após a penetração do miracídio (MALDONADO & ACOSTA- MATIENZO, 1947; PEREIRA ET AL., 1984). Os esporocistos secundários migram da região cefalopodal para as glândulas digestivas, local com riqueza nutritiva. O ovotéstis poderá também abrigar os esporocistos migrantes, mas com frequência menor. A migração dos esporocistos do local de penetração até as glândulas digestivas leva de dois a três dias e estes sofrem profundas modificações anatômicas e suas células germinativas podem originar as cercárias. Segundo JOURDANE ET AL. (1980) alguns esporocistos secundários também podem originar outra geração de esporocistos, que poderão gerar cercárias ou novos esporocistos.

A migração das cercárias faz-se tanto pelos espaços intercelulares, cheio de hemolinfa, como através do sistema venoso do caramujo. A passagem para o meio exterior processa-se pela formação de vesículas, no epitélio do manto e de pseudobrânquia (COELHO ET AL., 2008). Entretanto, algumas cercárias migram por muito tempo nos tecidos antes da emergência (PAN,1965; DUKE ,1952). Sabe-se que a emergência de cercárias pode ser nitidamente influenciada por estímulos externos como luminosidade e temperatura (Lutz, 1919, VALLE ET AL., 1971).

O desenvolvimento de *S. mansoni* em *Biomphalaria glabrata*, desde a penetração do miracídio até a produção de cercárias e sua liberação para o meio aquático, pode ocorrer dentro de um período de 27 a 30 dias, em condições ideais de temperatura (cerca de 28° C).

Um único miracídio pode gerar aproximadamente 300 mil cercárias (FAUST & HOFFMAN, 1934), em contato com o hospedeiro definitivo estas larvas reiniciam o ciclo.

### **1.3- DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DOS PRINCIPAIS HOSPEDEIROS INTERMEDIÁRIOS**

No Brasil já foram descritas dez espécies e uma subespécie de *Biomphalaria*: *B. glabrata* (Say,1818), *B. tenagophila* (Orbigny,1835), *B. straminea* (Dunker,1848), *B. amazonica* Paraense, 1966, *B. peregrina* (Orbigny,1835) *B. occidentalis* Paraense, 1981, *B. intermedia* (Paraense & Deslandes, 1962), *B. schrammi* (Crosse, 1864), *B. oligoza* Paraense, 1975, *B. kuhnia* (Clessim, 1883) e *B. tenagophila guaibensis* Paraense, 1984. Entretanto, as que possuem importância na transmissão da esquistossomose são apenas três: *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*, pois somente estas foram encontradas naturalmente infectadas e eliminando cercárias (PARAENSE, 1972). *B. amazonica* e *B. peregrina* podem ser infectadas experimentalmente e, por isso, são consideradas hospedeiras em potencial do *S. mansoni* (CORRÊA & PARAENSE, 1971; PARAENSE, 1973).

*B. glabrata*, tem como localidade-tipo Guadalupe (PILSBRY, 1934). No Brasil é a principal espécie transmissora, é altamente suscetível à infecção pelo trematódeo, sendo sua distribuição geográfica sobreposta às áreas nas quais a doença atinge altas prevalências. *B. glabrata* foi notificada no Distrito Federal e em 16 estados brasileiros: Alagoas, Bahia, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Minas Gerais, Pará, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, São Paulo, Sergipe (CARVALHO ET AL., 2008; PARAENSE, 2001). A presença dessa espécie no município de Esteio-Rio Grande

do Sul representa um avanço de 500 km na sua distribuição no país. *B. glabrata* tinha como limite de sua distribuição geográfica a bacia do rio Parapanema, na divisa dos estados de São Paulo com Paraná.

*B. tenagophila* tem como localidade-tipo Província de Corrientes na Argentina. Além do Brasil esta espécie também ocorre na Bolívia, Paraguai, Uruguai, Peru e Argentina (PARAENSE, 2001). Segundo BORDA & REA (1997, 2007) a possibilidade da esquistossomose se expandir para a Argentina e Paraguai esta associado ao fato de determinadas populações de *B. tenagophila* provenientes destas duas localidades, apresentarem-se suscetíveis à determinadas cepas de *S. mansoni*. No Brasil é a segunda espécie em importância na transmissão da esquistossomose e encontra-se distribuída em uma extensa faixa costeira do Brasil, desde o Sul da Bahia até o Rio grande do Sul (Chuí). É a principal espécie transmissora em extensas áreas do estado de São Paulo e está presente em coleções hídricas de todas as bacias hidrográficas do estado (TELES, 2005). As maiores concentrações de criadouros da espécie acontecem nas vizinhanças dos cursos dos rios Paraíba do Sul, Ribeira de Iguapé, no terço inicial do Tietê e em partes da zona litorânea. *B. tenagophila* também é responsável por focos isolados de transmissão da esquistossomose humana nos estados de Minas Gerais, Santa Catarina, Rio de Janeiro. Em Minas Gerais, *B. tenagophila* infectada com *S. mansoni* foi notificada nos municípios de Jaboticatubas, Itajuba, Belo Horizonte e Ouro Branco (MELO & PEREIRA, 1985; CARVALHO ET AL., 1985; SILVA ET AL., 1994). *B. tenagophila* vem ampliando consideravelmente sua distribuição pelo território brasileiro bem como aumentando a sua importância na transmissão da esquistossomose principalmente nas regiões sul e sudeste do país (PARAENSE & CORRÊA, 1987a).

*B. straminea* é a espécie com distribuição geográfica mais extensa no país, foi notificada em 24 estados brasileiros: Acre, Alagoas, Amazonas, Bahia, Ceará, Espírito do Santo, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, Santa Catarina, São Paulo, Sergipe, Tocantins, Roraima, além do Distrito Federal (CARVALHO ET AL.; 2008; PARAENSE, 2001). Apresenta maior predomínio na região Nordeste, principalmente nos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia. Estudos têm demonstrado que *B. straminea* esta se adaptando em território paulista e expandindo para novos municípios, principalmente na bacia do rio Tietê (TELES & VAZ, 1987; TELES, 1996). Em decorrência de sua extensa distribuição, *B. straminea* é a espécie mais bem adaptada a todas variedades de climas e condições ecológicas do país. As taxas de infecção natural ao *S. mansoni* são inferiores a 1%, contudo são capazes de manter elevadas taxas de infecção humana em determinadas áreas do Nordeste (PARAENSE & CORRÊA, 1963). *B. straminea* é a única espécie responsável por altas taxas de prevalência da doença no estado do Ceará.

#### 1.4- ALGUNS ASPECTOS BIOLÓGICOS DO GÊNERO *Biomphalaria*

Os registros geológicos mais antigos para os moluscos da família Planorbidae comprovam sua presença na Europa e nos Estados Unidos desde o período Jurássico, há cerca de 160 milhões de anos. Esses caramujos são dotados de uma notável capacidade de proliferação. De acordo com estimativas realizadas por PARAENSE (1955), um único espécime de *B. glabrata* é capaz de produzir em 90 dias, cerca de 11.500.000 descendentes viáveis. Este mesmo autor cita que é comum o processo de autofecundação de planorbídeos nos ambientes que tiveram suas populações aniquiladas, a reconstituição nesse caso é feita por poucos indivíduos sobreviventes. Um único exemplar poderá fundar uma pequena colônia inicial por autofecundação, prosseguindo a multiplicação dos seus descendentes por cruzamento. Apesar da alta capacidade de autofecundação, estes moluscos têm absoluta preferência pela fecundação cruzada, que garante a preservação das espécies, mediante o fluxo de genes e as recombinações, que lhe conferem variabilidade gênica (PARAENSE, 1955).

Aspectos tais como fecundidade e fertilidade foram estudados extensivamente em condições de laboratório (PENIDO & DESLANDES, 1951; PERLOWAGORA, 1958; REY, 1956; MAGALHÃES & DE LUCCA, 1971; KAWAZOE, 1977; FREITAS, 1973; COSTA ET AL., 2004). Entretanto, os dados obtidos para um mesmo grupo de caramujo podem variar de acordo com a técnica de criação e quando submetida a condições ambientais diferentes. Apesar das limitações, os estudos realizados em laboratórios evidenciam que *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea* possuem uma grande capacidade reprodutiva. KAWAZOE (1976, 1977) estudou comparativamente a fecundidade, fertilidade e o período embrionário de *B. tenagophila* e *B. glabrata*, no período de uma ano, em condições de laboratório. Neste experimento verificou-se que *B. glabrata* foi mais fecunda do que *B. tenagophila*. A taxa de

eclosão das duas espécies foram superiores a 90%. As observações realizadas sobre a duração do período embrionário mostraram que as médias expressas em dias, encontradas para *B. glabrata* e *B. tenagophila* foram respectivamente de 7,6 e 8 dias .

COSTA ET AL (2004) demonstraram que a população de *B. straminea* de Petrolândia foi mais fecunda do que a população de *B. glabrata* de Paulista. Estas duas populações de caramujos são procedentes do estado de Pernambuco, de acordo com os autores os resultados podem ajudar a compreender a superioridade competitiva de *B. straminea* sobre *B. glabrata* em determinadas áreas do nordeste.

COOPER ET AL (1996) relataram que caramujos *B. glabrata* que tiveram uma drástica redução na postura de ovos devido à infecção pelo *S. mansoni*, foram capazes de atuarem como macho transferindo o seu esperma para outro indivíduo. TRIGWELL & DUSSART (1998) descrevem a respeito do fenômeno de protândria em *B. glabrata*.

Os moluscos do gênero *Biomphalaria* podem ser encontrados em coleções de água doce parada ou pouco corrente, em ambientes naturais (córregos, riachos, lagos, pântanos) ou artificiais (cisternas, valas de irrigação, açudes ou quaisquer áreas natural ou artificialmente alagadas). A possibilidade de obtenção de oxigênio dissolvido na água e no ar é uma estratégia relevante para a sobrevivência dos caramujos em ambientes pobres em oxigênio ou poluídos por matéria orgânica. Os caramujos alimentam-se de vegetais, algas, e microorganismos presentes no fundo e nas margens das coleções hídricas. Os exemplares recém-eclodidos alimentam-se preferencialmente de algas unicelulares (FREITAS, 1973).

As densidades das populações dos caramujos flutuam de maneira sazonal ou irregularmente, por influência de um conjunto de diversos fatores bióticos e abióticos. BARBOSA & BARBOSA (1994) ressaltam que os fatores climáticos, como chuva e

temperatura, podem causar flutuações na distribuição, no tamanho e na densidade das populações de caramujos. Em regiões tropicais, as chuvas influenciam a dinâmica populacional dos caramujos, reduzindo o tamanho das populações e promovendo a sua dispersão. Segundo REY (1956) as chuvas só concorrem, em geral, para a negatização ou redução dos caramujos em caráter transitório, pois é justamente nesta época que ocorre um aumento dessa população malacológica, devido a formação dos novos focos para o desenvolvimento e multiplicação dos caramujos. Durante a estação seca, algumas coleções hídricas tornam-se reduzidas ou secam completamente, provocando um decréscimo populacional de caramujos ou mesmo a extinção de certas populações (BARBOSA & OLIVIER, 1958). Segundo estes autores, com o retorno das águas a esses habitats, os caramujos crescem, se reproduzem e rapidamente repovoam esses ambientes. O repovoamento de planorbídeos em determinados ambientes, após o retorno das águas, deve-se principalmente aos indivíduos que resistem à dessecação. A capacidade de resistir à dessecação é uma característica encontrada em algumas espécies de *Biomphalaria*. Estudos realizados com *B. glabrata* têm demonstrado que em estado de anidrobiose, este molusco retrai-se para o fundo da concha, ficando reduzido a 1/6 ou 1/7 de seu volume normal (BRUMPT, 1941) e quando infectados pode ocorrer o interessante fenômeno de parada temporária do desenvolvimento parasitário (OLIVER ET AL., 1954; BARBOSA & COELHO, 1953). Entretanto, quando esses moluscos retornam à sua atividade biológica normal, os esporocistos de *S. mansoni* que estavam na fase inicial da infecção completam o seu desenvolvimento.

## 1.5- ASPECTOS GENÉTICOS E DO SISTEMA INTERNO DE DEFESA DE *B. glabrata*

Caramujos do gênero *Biomphalaria* possuem um genoma haplóide composto por 18 cromossomos. Análises de vários isolados da *B. glabrata* revelaram que esse cariótipo é relativamente conservado (GOLDMAN ET AL., 1984). O tamanho do genoma de *B. glabrata* é de de aproximadamente 931Mb ( RAGHAVAN & KNIGHT, 2006).

Variações na suscetibilidade de *B. glabrata* de diversas áreas geográficas e também diferenças na infectividade das cepas de *S. mansoni* foram relatados por inúmeros autores (FILES & CRAM, 1949; KUNTZ, 1952; BARBOSA & BARRETO, 1960; PARAENSE & CORREA, 1963 ).

Estudos pioneiros revelaram que a suscetibilidade de *B. glabrata* ao *S. mansoni* era de caráter hereditário e que provavelmente fatores genéticos estariam envolvidos (NEWTON, 1952). Neste estudo foram realizados vários cruzamentos entre a linhagem suscetível de *B. glabrata* de Porto Rico com a linhagem resistente da Bahia. Os descendentes foram testados com a cepa *S. mansoni* de Porto Rico (PR-1) apresentando taxas de infecção de 0 a 17,4% para F1, de 3 a 58,3% para F2 e uma geração F3 com taxas de 0 a 82%. É preciso salientar que a linhagem *B. glabrata* da Bahia utilizada não é totalmente resistente, pois quando jovem apresenta-se suscetível à infecção por *S. mansoni*. Posteriormente, outros cruzamentos foram realizados e descobriu-se que o caráter resistência do molusco à infecção adquirido na maturidade segue uma segregação mendeliana e de caráter dominante (RICHARDS, 1970).

A idade é um outro fator que afeta a suscetibilidade em *B. glabrata*, caramujos mais jovens são mais suscetíveis à infecção. A suscetibilidade de *B. glabrata* jovem à infecção pelo

*S. mansoni* parece ser regulada por um conjunto de fatores genéticos ligados a quatro ou mais genes (RICHARDS & MERRITT, 1972).

Fatores genéticos do parasito também influenciam a infectividade das cepas, pois os mesmos estoques de caramujos que foram suscetíveis à cepa de *S. mansoni* de Porto Rico (PR-1) apresentaram-se resistentes à cepa de *S. mansoni* de Santa Lúcia (L) (RICHARDS, 1975). O mesmo autor, utilizando diferentes estoques de caramujos e diversas cepas de *S. mansoni* observou que ocorre uma grande variação genética na relação *B. glabrata* e *S. mansoni* (RICHARDS & SHADE, 1987).

Grande parte dos trabalhos elaborados por RICHARDS sobre a suscetibilidade de *B. glabrata*, aqui mencionados, foram realizados a partir de estoques de diferentes linhagens isogênicas de *B. glabrata* com diferentes níveis de suscetibilidade. Estes estoques foram obtidos, em condições de laboratório, por meio de fecundação cruzada entre *B. glabrata* resistente e suscetível e depois por autofecundação durante várias gerações sucessivas e inúmeros testes de suscetibilidade com diferentes cepas de *S. mansoni*. Os métodos envolvidos para obtenção destes estoques foram descritos por RICHARDS (1973 b, 1975).

Atualmente com o advento da biologia molecular, várias estratégias têm sido utilizadas com o intuito de identificar genes que estão envolvidos na imunidade inata de *Biomphalaria*. Grande parte dos genes relacionados ao mecanismo de defesa de *B. glabrata* têm sido seqüenciados de ESTs de hemócitos (“Expressed Sequence Tags”), estudos proteômicos e proteínas presentes no plasma do caramujo (MILLER ET AL., 2001; LOCKYER ET AL., 2004; RAGHAVAN ET AL., 2003; GUILLOU ET AL., 2007).

MITTA ET AL. (2005) ao construírem uma biblioteca de cDNA de hemócitos de *B. glabrata* resistente ao *Echinostoma caproni*, verificaram que determinadas seqüências apresentavam homologia com genes que estavam envolvidos na imunidade inata de

invertebrados. Dentre estas seqüências foram identificadas similaridade com genes que codificam peptídeos antimicrobianos como BPI (“Bactericidal/permeability-increasing protein”) e LBP (“Lipopolysaccharide binding protein”), citocinas pró-inflamatória como MIF (“Macrophage migration inhibitory factor”), metalo e serinoproteinase, inibidores de protease, proteínas que estão envolvidas em reconhecimento como FREP (“Fibrinogen Related Proteins”) e PGRP (“Peptidoglycan recognition protein”) e proteínas que atuam na migração e ativação celular, como  $\beta$  integrina. Entretanto, estes genes estavam presentes tanto nos indivíduos resistentes como suscetíveis de *B. glabrata*, o nível de expressão gênica que foi diferenciado entre estas duas linhagens, após a exposição ao parasito.

Outra metodologia que vem sendo explorada para o estudo da interação *B. glabrata-E. caproni* é a hibridização subtrativa supressiva (SSH). Esta técnica permite comparar por exemplo, a biblioteca de cDNA de caramujo resistente e suscetível e amplificar por PCR os genes diferencialmente expressos. Por meio deste método seqüências similares a inibidores de serino protease e Lectina Tipo C foram caracterizados na biblioteca de cDNA da linhagem resistente de *B. glabrata*, apresentando elevados níveis de expressão quando comparado com a linhagem suscetível (BOUCHUT ET AL., 2007). GUILLOU ET AL. (2007) através desta técnica identificaram 10 genes que podem estar relacionados à resistência de *B. glabrata* ao trematódeo *E. caproni*. Dentre eles foram encontrados genes que codificam proteínas com similaridade a glutathione S-transferase e superóxido dismutase, peptídeos com atividade antimicrobiana (LBI, BPI) inibidores de proteases (cistatina) e lectinas tipo C. O gene semelhante à cistatina (inibidor de protease) apresentou expressão aumentada durante a infecção por *E. caproni*. Os autores também relataram que, através da hibridização *in situ*, foi possível verificar que esse gene estava sendo expresso principalmente por hemócitos agregados e nas cápsulas presentes no sítio de infecção (área do coração). Dentre os genes

citados o que apresenta similariedade com a lectina tipo C parece ser um forte candidato ao gene que pode estar associado à resistência, pois esta representa a maior molécula de reconhecimento de carboidratos no sistema imune de invertebrados e estão envolvidas nos processos tais como reconhecimento, opsonização e adesão celular (DUCLERMOTIER ET AL., 1999). Em vertebrados, as lectinas participam de mecanismos de reconhecimento durante a resposta inata. Outro gene que podem estar envolvido no nível de suscetibilidade da relação *Biomphalaria*- trematoda são os que codificam os FREP-s “Fibrinogen- Related Proteins”. Estas moléculas contêm dois tipos de domínios funcionais: na porção N terminal as proteínas codificadas por estes genes possuem um domínio com similaridade à Superfamília de imunoglobulinas (IgSF) e na porção C terminal um domínio de fibrinogêneo (ZHANG ET AL., 2001; 2003). Embora a função destes FREPs precise ser melhor estudada, alguns indícios sugerem que estes podem exercer um papel importante na imunidade inata do molusco. Estudos prévios demonstraram que alguns tipos de FREPs, são capazes de ligarem-se a superfície do parasito e também de precipitarem antígenos solúveis dos trematódeos.

Na busca de genes candidatos que podem estar associados ao caráter resistência, os hemócitos, células de defesa do caramujo, têm sido estudados extensivamente. O sistema interno de defesa dos caramujos é composto por elementos celulares, constituídos pelos hemócitos ou amebócitos, e por fatores solúveis presentes na hemolinfa. A resistência destes caramujos à infecção por *S. mansoni* tem sido atribuída à capacidade dos hemócitos de envolver e destruir o miracídio recém penetrado (VAN DER KNAAP & LOKER 1990). Os estudos histológicos, que evidenciam reações teciduais em torno dos esporocistos (GUARALDO ET AL., 1981) e o transplante do órgão produtor de hemócitos (APO) de uma linhagem resistente de *B. glabrata* para uma suscetível obtendo uma redução significativa na

produção de esporocistos e cercárias nos caramujos transplantados (SULLIVAN & SPENCER, 1994), reforçam a importância dos hemócitos na infecção de *B. glabrata*.

O processo de destruição dos esporocistos por hemócitos inicia-se com a atração dos hemócitos para a proximidade do esporocisto primário, sugerindo uma resposta quimiotática. A etapa seguinte é o contato do hemócito com o tegumento do parasito resultando no encapsulamento do esporocisto e, em alguns casos, destruição dos mesmos. No processo de encapsulamento e destruição do esporocisto existe uma interação muito forte entre hemócitos e os fatores solúveis presentes na hemolinfa.

BAYNE ET AL. (1980 a, b) foram os primeiros a desenvolver métodos *in vitro* para avaliar o efeito da hemolinfa de *B. glabrata* sobre o esporocisto primário de *S. mansoni* transformado axenicamente. Nestes estudos os autores mostraram que a hemolinfa livre de células, obtida de linhagens suscetíveis e resistentes de *B. glabrata* são incapazes de alterar visivelmente a morfologia do esporocisto *in vitro*, o mesmo acontecendo com hemolinfa contendo hemócitos de linhagens suscetíveis. Entretanto, quando os hemócitos de linhagens suscetíveis juntamente com fatores solúveis da hemolinfa de linhagens resistentes são incubados com os esporocistos, os hemócitos adquirem capacidade de destruí-los.

GRANATH & YOSHINO (1984) confirmaram a importância de fatores solúveis da hemolinfa no processo de destruição de esporocistos de *S. mansoni* em estudos *in vivo*. Estes autores relataram que a transferência de plasma obtido de linhagens resistentes de *B. glabrata* para linhagens suscetíveis, resultou em uma redução da taxa de infecção de linhagens de *B. glabrata* pelo *S. mansoni*. A atuação de fatores solúveis da hemolinfa de *Biomphalaria* na ativação de hemócitos foi sugerida por FRYER & BAYNE (1996), que avaliaram *in vitro*, a habilidade de hemócitos de *B. glabrata* suscetíveis e resistentes ao *S. mansoni*, em interiorizar partículas de poliestireno cobertas por componentes solúveis da hemolinfa.

Segundo BAYNE (1983) as lectinas presentes na hemolinfa de gastrópodes poderiam mediar o reconhecimento de partículas ou parasitos. LOKER ET AL. (1984) detectaram na hemolinfa de moluscos fatores que aglutinam e opsonizam partículas, sendo estes fatores identificados como lectinas. Nos moluscos as lectinas são secretadas pelos hemócitos e podem estar solúveis na hemolinfa ou expressas na superfície dos hemócitos circulantes (RICHARDS & RENWRANTZ, 1991). A ligação lectina-carboidrato permite a opsonização e aglutinação de partículas presentes na hemolinfa dos moluscos. Segundo BAYNE (1990), a ligação lectina-carboidrato possivelmente leva a uma mudança conformacional do complexo, que pode resultar na ativação do hemócito. Segundo ZELCK & BECKER (1990), a resistência ou suscetibilidade de espécies ou linhagens de *Biomphalaria* a infecção por *S. mansoni* pode estar relacionada à presença ou ausência de determinadas lectinas na hemolinfa. Além das lectinas, outras proteínas tem sido identificadas na hemolinfa de moluscos. Estas proteínas parecem ter função homóloga à mediadores celulares já caracterizados em vertebrados, e podem estar envolvidas na ativação dos hemócitos durante a infecção. Dentre estas podemos citar: moléculas de proteínas semelhantes citocinas de vertebrados (IL-1 alfa, IL-1 beta, IL-2, IL-6 e TNF alfa).

O encapsulamento de esporocisto de *S. mansoni* por hemócitos necessariamente não resulta na destruição do parasito. Entretanto, são capazes de produzir uma série de intermediários ativos de nitrogênio (NOS) incluindo o oxido nítrico (TAFALLA ET AL., 2002).

## 1.6- ASPECTOS ENVOLVIDOS NA SUSCETIBILIDADE DE *B. tenagophila*

. A resistência de *B. tenagophila* assim como de *B. glabrata* também está associada a fatores genéticos. *B. tenagophila* de 18 localidades apresentaram taxas de infectividade que variavam de 0 a 91,5% quando expostos à cepa SJ de *S. mansoni* (PARAENSE & CÔRREA, 1978).

A suscetibilidade de *B. tenagophila* também está relacionada à cepa SJ de *S. mansoni* (São José dos Campos-SP), pois exemplares de *B. tenagophila* coletados em Belo Horizonte-MG e Cabo Frio-RJ mostraram-se suscetíveis quando desafiados com cepa SJ de *S. mansoni* e resistentes quando infectados com a cepa LE de Belo Horizonte (CORRÊA ET AL., 1979). Nos vales do Paraíba do Sul e Ribeira, áreas dos principais focos endêmicos da esquistossomose em São Paulo, as populações de *B. tenagophila* apresentam índices de suscetibilidade elevados às cepas locais do *S. mansoni*. Isto pode significar um ajustamento fisiológico bem sucedido das linhagens locais de caramujos a essas cepas do parasito e vice-versa (CHIEFFI, 1975).

OLIVEIRA ET AL (2008) investigaram a variabilidade genética entre linhagens parcialmente resistente e suscetível de *B. tenagophila* e *B. glabrata* por meio da técnica RAPD-PCR (Randomly Amplified Polymorphic DNA- Polymerase Chain Reaction). Ao comparar o perfil molecular entre indivíduos resistente e suscetível de *B. tenagophila*, foi observado pouca variação genética entre os exemplares analisados. Entretanto, os caramujos suscetíveis desta espécie apresentaram marcadores polimórficos de aproximadamente 5056, 3136 e 504 pares de base.

SANTOS ET AL. (1979) identificaram pela primeira vez uma linhagem geográfica de *B. tenagophila* absolutamente resistente ao *S. mansoni*. Esta linhagem foi coletada na Estação

Ecológica do Taim-Rio Grande do Sul e vem sendo alvo de muitos estudos (FREITAS ET AL., 1985; BEZERRA ET AL., 1997, 2003; MARTINS-SOUZA ET AL., 2003; ROSA ET AL., 2005; PEREIRA ET AL., 2006; BARBOSA ET AL., 2006; NEGRÃO-CORRÊA ET AL., 2007; COELHO ET AL., 2008). *B. tenagophila* do Taim permanece resistente em todas as idades, a várias cepas de *S. mansoni*, a diferentes cargas de miracídios (COELHO ET AL., 2004).

Trabalhos preliminares mostram que durante as primeiras horas de infecção, a linhagem *B. tenagophila* do Taim apresenta uma redução de hemócitos circulantes (BEZERRA ET AL., 1997) e uma intensa reação celular no sítio da infecção (MARTINS-SOUSA, 1999). A importância dos hemócitos no controle da infecção foi diretamente demonstrada quando linhagens de *B. tenagophila* suscetíveis foram transplantadas com o órgão hematopoético da linhagem *B. tenagophila* do Taim. Os exemplares suscetíveis transplantados apresentaram-se resistentes à infecção por *S. mansoni* (BARBOSA ET AL., 2006). Outros pesquisadores demonstraram a importância dos fatores solúveis da hemolinfa ao transferir a hemolinfa da *B. tenagophila* Taim (resistente) para a linhagem suscetível *B. tenagophila* Cabo Frio (PEREIRA ET AL., 2008; COELHO & BEZERRA, 2006).

Por meio da técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) e RFLP (Restriction Fragments Length Polimorphisms) verificou-se que a população *B. tenagophila* do Taim apresenta um perfil molecular com três fragmentos (800, 470 e 350 pb), diferindo de outras populações de *B. tenagophila* do Brasil que possui apenas as duas primeiras bandas (BARBOSA ET AL., 2006). O fragmento de 350 pares de base é típico da linhagem do Taim .

Ensaio envolvendo o cruzamento de *B. tenagophila* Taim com exemplares suscetíveis de *B. tenagophila* de Belo Horizonte- MG e Joinville-SC mostraram que descendentes F1 resultantes de tais cruzamentos apresentavam índices baixíssimos de suscetibilidade ao *S.*

*mansoni* (SANTOS ET AL., 1979; FREITAS ET AL., 1985). Recentemente, foram realizados vários cruzamentos entre a linhagem resistente (*B. tenagophila* Taim) com a suscetível albina (*B. tenagophila* Joinville, SC). Estudando o fenótipo dos descendentes F1 e F2 destes cruzamentos, verificou-se que o caráter resistência pode estar sendo determinado por dois genes dominantes (ROSA ET AL., 2005). Dando continuidade a tais estudos o nosso grupo de pesquisa propôs analisar a transmissão do caráter resistência de uma população mista de *B. tenagophila* constituída por indivíduos resistentes e suscetíveis, visando um possível modelo de controle biológico da transmissão da esquistossomose e também avaliar os mecanismos de defesa que estão sendo transmitidos aos descendentes destes cruzamentos.

## **1.7- CONTROLE BIOLÓGICO DA TRANSMISSÃO DA ESQUISTOSSOMOSE**

O controle da esquistossomose consiste de uma série de medidas como saneamento básico, educação e saúde, tratamento das pessoas infectadas e uso de moluscidas. O Relatório de Comitê de Peritos em Epidemiologia considera que apesar das suas limitações, o controle químico continua sendo o melhor método para controlar os moluscos (OMS 1993).

Os estudos relacionados ao controle biológico dos moluscos transmissores da esquistossomose têm sido realizados desde a década de 50, principalmente em caráter experimental. MADSEN (1990) em uma extensa revisão do assunto classificou os agentes biológicos que poderiam funcionar como controle dos caramujos, em três categorias: micropatógenos, predadores e competidores.

Os micropatógenos incluem vírus, bactérias, protozoários e fungos. Em condições de laboratório, bactérias gram-negativas dizimaram culturas de *B. glabrata*, *B. africana* e *B.*

*pfeifferi* (BERRY, 1949; MICHELSON, 1961). *Bacillus pinnotti* foi a bactéria mais bem estudada (DIAS, 1955), entretanto TRIPP (1961) questiona a respeito da sua patogenicidade, pois ao testá-la em *B. glabrata* não obteve resultados satisfatórios.

Em relação aos protozoários, *Dimoeriopsis destructor*, *Glaucoma paedophthera*, *Coleps hirtus* e *Barrouxia bulini* foram indicados como agentes importantes para controlar os planorbídeos, pois foram capazes de destruir principalmente as desovas de *Biomphalaria* e *Bulinus* (HOLLANDE & CHLABELARD, 1953., BERGHE, 1934; MILWARD- DE – ANDRADE, 1971).

Existem poucos relatos de fungos que atuam como agentes controladores de moluscos, *Catenaria* sp. é o mais citado, pois este foi efetivo na destruição de desovas de *B. glabrata* (COWPER, 1946). Os estudos realizados com os micropatógenos ficaram limitados as condições de laboratório e mostraram-se eficientes apenas no controle de desovas e caramujos recém-eclodidos.

As planárias, sanguessugas, insetos (adultos e larvas), crustáceos e os peixes são considerados como predadores de planorbídeos. Em condições laboratoriais, as sanguessugas principalmente as do gênero *Helobdella* são predadores ativos de *Biomphalaria* (BRUMPT, 1941).

Quanto aos insetos, larvas de *Luciola cruciata* (OKADA, 1928; MARIA ET AL., 1967) e de alguns dípteros como as do gênero *Sciomyza* (BERG, 1953) têm atividade predatória sobre *Biomphalaria*. VOELKER (1968), após observar que o coleóptero aquático *Limnogeton fieberi* (Belostomatidae) se alimenta de caramujos para desenvolver-se, indica este hemíptero para controle biológico de planorbídeos.

Dentre os crustáceos, LAGRANGE & FAIN (1952) cita os caranguejos da espécie *Potamon lirrangese* e *P. didieri* para o controle biológico de moluscos. DESCHIENS &

LAMY (1954, 1955) comprovaram que em laboratório, as lagostas dos gêneros *Astacus* e *Cambarus*, atacam e destroem diversas espécies de planorbídeos. SOHN & KORNICKER (1972) verificaram que o Ostracoda *Cypretta kawatai*, em condições de laboratório, é um efetivo predador de *B. glabrata*.

A utilização de peixes no combate aos moluscos transmissores de doença foi sugerida por diversos autores e várias espécies foram consideradas como predadores em potencial de planorbídeos dentre os quais *Tilapia melanopleura*, *Panagasius panagasius*, *Lepomis microlophus*, *Astronotus ocellatus*, *Serranochromis macrocephala*, *Barbus conchoniuis*, *Cichlasoma biocellatum*, *C. ocellatum* e *Geophagus brasiliensis* (ANDERSON & GOBERT, 1924; OLIVER-GONZÁLEZ, 1946; HORA, 1952; LAGRANGE, 1953; ANDRADE, 1968; ANDRADE & ANTUNES, 1969; GOVEA & MOTTA, 1971; WEINZETT & JURBERG, 1990; CONSOLI ET AL., 1991; CHIMBARI ET AL., 1997).

Dentre os anfíbios e répteis sugeridos para controlar moluscos de importância médica, encontra-se o sapo *Xenopus laevis* (LAGRANGE & FAIN, 1952). Coelho et al. (1975), estudando a potencialidade de predação à *B. glabrata* por duas espécies de quelônios sul americanos: *Chrysemys (Trachemys) dorbignii* e *Platemys spixii*, verificaram que a primeira espécie apresenta melhores possibilidades de emprego no combate à *B. glabrata*, pois em poucas horas predar um número considerável de caramujos. Entretanto, esses autores sugerem novos estudos em laboratório e em condições naturais sobre o assunto. Apesar dos inúmeros predadores de caramujo, ainda não há qualquer espécie de predador que tenha eficácia comprovada contra os moluscos e que tenha sido utilizada em campanhas de controle.

A interação competitiva entre caramujos tem sido muito estudada, e há várias espécies potencialmente concorrentes entre si, tais como: *Thiara granifera* Lamarck, 1822, *Melanooides*

*tuberculatus*, Müller, 1774, *Marisa cornuarietis* (Linnaeus, 1758) *Helisoma duryi* (Wetherby, 1879) e *Pomacea haustum* (Reeve, 1856).

O surgimento de *Marisa cornuarietis* nas coleções hídricas de Porto Rico foi associado com o desaparecimento de *Biomphalaria* e, conseqüentemente, com a redução da esquistossomose nessas áreas, desde então esta espécie vêm sendo amplamente explorada (OLIVER-GONZÁLEZ ET AL., 1956; CHERNIN ET AL., 1956; FERGUNSON & PALMER, 1958; OLIVER-GONZÁLEZ & FERGUNSON, 1959; HARIDI ET AL., 1985).

Em Santa Lúcia, Martinica, Porto Rico *Melanoides tuberculatus* exerceu um papel importante na redução de *B. glabrata* (PONTIER & JOURDANE, 2000). Entretanto, o reaparecimento de *B. glabrata* e com ela o surgimento de focos importantes de *S. mansoni* em algumas áreas de Guadalupe e Venezuela, locais onde essa espécie foi introduzida, fez com esse modelo fosse questionado (ALARCÓN DE NOYA & NOYA, 1997).

Outro molusco que foi indicado para controle biológico de caramujos de importância médica foi *Pomacea haustum*. MILWARD- DE -ANDRADE (1974) observou que a população de *B. glabrata* da localidade de Calciolândia, MG, declinou sensivelmente após a introdução de *P. haustum* na área, sugerindo que este molusco pode ser de grande valia no controle da esquistossomose. PAULINYI & PAULINI (1972) ao estudarem a dinâmica das populações de *B. glabrata* e *P. haustum* verificaram alguns pontos importantes. Em condições de laboratório *P. haustum* cresce mais rápido e consome mais alimento do que *B. glabrata*, *Pomacea* alimenta-se de desovas de *B. glabrata* na ausência de outros alimentos e causa alta mortalidade entre os recém- eclodidos. Estes dados demonstram que quando estes moluscos estão no mesmo aquário, *Pomacea* apresenta uma nítida vantagem com relação *B. glabrata*. Por outro lado, foi observado que em determinadas áreas as duas espécies

coexistiram por até dez anos sem alterações das densidades populacionais dos planorbídeos (PARAENSE, 1987 b).

BARBOSA & BARBOSA (1995) tomando como princípio a superioridade competitiva de *B. straminea* na maioria das situações experimentais, introduziram em 11 riachos do estado do Paraíba uma linhagem resistente de *B. straminea*. Os locais onde ocorreram a introdução eram habitados quase que exclusivamente por *B. glabrata*. Após dois anos de estudos esses autores verificaram que dos 11 riachos, 9 foram completamente colonizados pela *B. straminea*. Apesar do êxito desse modelo, sabe-se que em diversas partes do Brasil, onde eram considerados redutos naturais de *B. straminea* estão sendo invadidos pela *B. glabrata* (PARAENSE & ARAÚJO 1984). A superioridade competitiva de *B. straminea* não é absoluta, e pode variar de acordo com situações específicas.

Em suma, as práticas de controle que foram citadas são ineficazes e a utilização de espécies competidoras para controle dos vetores da esquistossomose não são funcionais, pois várias espécies de moluscos podem coexistir com os planorbídeos em habitats heterogêneos e instáveis (ABÍLIO, 2002). Existe coabitação prolongada em criadouros naturais, sem ocorrer exclusão competitiva.

O grupo de pesquisa coordenado pelo Prof. Paulo Marcos, propõe uma nova abordagem de controle biológico para a esquistossomose. A nova proposta consiste na introdução em larga escala de *B. tenagophila* do Taim, linhagem completamente resistente à infecção por *S. mansoni*, em áreas onde *B. tenagophila* é a única espécie transmissora, forçando assim o cruzamento com os caramujos locais. A expectativa é que ao longo do tempo, ocorra a predominância de exemplares com o patrimônio genético da resistência ao trematódeo, visto que esta resistência é de caráter dominante. Esse modelo pode representar uma alternativa para o controle da transmissão da esquistossomose em determinadas áreas do

estado de São Paulo, pois a maior parte dos casos autóctones de esquistossomose diagnosticados em território paulista resulta dos contatos com ambientes hídricos colonizados por *B. tenagophila* (TELES ET AL., 2002, 2003).

## OBJETIVOS

### 2.1-OBJETIVO GERAL :

Avaliar em condições de laboratório e campo o mecanismo de ação e eficácia da utilização de *Biomphalaria tenagophila* do Taim como possível modelo de controle biológico da transmissão da esquistossomose em áreas onde *B. tenagophila* é a principal espécie transmissora.

### 2.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Verificar nas progênes F1 e F2 a participação do sistema interno de defesa no mecanismo de destruição dos esporocistos de *S. mansoni* e a transmissão do marcador molecular de 350 pb.

-Avaliar em condições de laboratório, a transmissão do caráter resistência da população *B. tenagophila* do Taim quando mantido em diferentes proporções com a população suscetível *B. tenagophila* de Joinville, bem como analisar a taxa de sobrevivência e a fecundidade destas populações quando submetidos ou não à pressão do parasito.

- Verificar o efeito da introdução da linhagem resistente *B. tenagophila* do Taim em focos de transmissão de esquistossomose situados no município de Bananal onde o parasito é transmitido exclusivamente pela população local de *B. tenagophila*.

Parte 1- Participação do sistema interno de defesa no mecanismo de destruição dos esporocistos de *S. mansoni* e a transmissão do marcador molecular de 350 pb nas progênes F1 e F2.

### 3-MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1- CARAMUJOS

Foram utilizados caramujos de uma linhagem suscetível e uma resistente de *B. tenagophila*. A linhagem resistente à infecção por *S. mansoni* foi coletada na Estação Ecológica do Taim do Rio Grande do Sul (SANTOS ET AL., 1979). A mesma é mantida, sem qualquer tipo de seleção em favor do caráter resistência, há mais de 29 anos no moluscário do laboratório de Esquistossomose do Departamento de Parasitologia- ICB/UFMG. A linhagem suscetível albina é oriunda da cidade de Joinville (SC) e foi gentilmente cedida pelo Dr. Wladimir Lobato Paraense em outubro de 2000. Ensaio anteriores revelaram que essa linhagem é suscetível tanto a cepa LE como S.J de *S. mansoni* (FREITAS ET AL., 1985; ROSA ET AL; 2005)

#### 3.2- PARASITOS

A cepa de *S. mansoni* utilizada neste experimento foi a LE que vem sendo mantida nos laboratórios de Esquistossomose por 49 anos. Esta cepa foi isolada em 1959 de um paciente de Belo horizonte-MG com infecção crônica (VALADARES ET AL., 1981). Desde o isolamento a cepa LE é mantida através de sucessivas infecções em hamsters (*Mesocricetus auratus*) e em *B. glabrata*, de acordo com a técnica descrita por PELLEGRINO & KATZ (1968).

### 3.3- CRUZAMENTOS

Para verificar a transmissão do marcador de 350 pares de base, típico da população de *B. tenagophila* do Taim, e para estudar os mecanismos de resistência das progênes F1 e F2 foi necessário realizar uma série de cruzamentos. Para obtenção dos descendentes utilizou-se a técnica desenvolvida para o estudo de fecundação cruzada que usa a linhagem albina (PARAENSE, 1955). O caráter recessivo do albinismo em *B. tenagophila* de Joinville foi usado, neste caso, como um marcador fenotípico o que possibilitou distinguir principalmente os indivíduos (F1) gerados por fecundação cruzada (todos pigmentados) daqueles gerados por autofecundação (todos albinos). Para realizar o cruzamento foram utilizados 20 casais, sendo colocado um exemplar de *B. tenagophila* de Joinville albino junto com um exemplar de *B. tenagophila* do Taim pigmentado (Figura 1).



**Figura 1: Cruzamento entre exemplares de *B. tenagophila* do Taim (pigmentado) e *B. tenagophila* de Joinville (albino).**

Os casais com aproximadamente 5 mm de diâmetro, imaturos sexualmente, permaneceram juntos em um copo de plástico de 250 ml com aproximadamente 200 ml de água desclorada por 50 dias. Para a finalidade deste trabalho tanto as desovas dos caramujos albinos e algumas desovas dos pigmentados foram coletadas durante quatro semanas. As desovas obtidas dos pigmentados foram mantidas separadas, pois neste caso a confirmação de que estas foram geradas por fecundação cruzada ocorreu somente após a obtenção da F2. As desovas obtidas dos caramujos albinos foram observadas com o auxílio de um microscópio estereoscópico logo na primeira semana. As desovas com indivíduos pigmentados da geração F1, identificado pela presença de mancha ocular na base de cada tentáculo dos embriões a partir do 6<sup>a</sup> dia, foram transferidas para um aquário e mantidas até atingirem o tamanho de 5 mm. A geração F2 foi obtida através do cruzamento entre indivíduos F1 seguindo o mesmo procedimento já descrito acima. Parte dos descendentes F1 e F2 foram utilizados para os testes moleculares e a outra foi submetida aos estudos dos mecanismos de defesa.

### **3.4- IDENTIFICAÇÃO DO MARCADOR MOLECULAR DE 350 pb NAS PROGÊNIES F1 E F2.**

#### **3.4.1- EXTRAÇÃO DE DNA**

Para identificar se os descendentes obtidos do cruzamento entre *B. tenagophila* do Taim e *B. tenagophila* de Joinville apresentavam o marcador de 350pb, foi retirado um fragmento da região cefalopodal de 10 exemplares da população do Taim e 10 de Joinville, 9 exemplares da geração F1 e 16 da geração F2. A extração do DNA das células destes tecidos

foi realizada com o Kit de purificação de DNA Wizard Genomic (Promega), seguindo as instruções do fabricante e com algumas as modificações sugeridas por VIDIGAL ET A L. (2000). O pé de cada molusco foi lisado em 200 µl de solução de lise nuclear e incubado por um período de 12 horas, em 50µg/ml de proteinase K, em banho-maria a 37<sup>a</sup> C. Depois, 80 µl de solução de precipitação proteica foi adicionado ao tubo inicial. O material foi previamente agitado usando o vortex por 20 a 30 segundos e logo em seguida centrifugado a 13000 rpm por 3min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo contendo 200 µl de isopropanol para precipitar o DNA, este material foi homogeneizado por inversão durante 20 min e depois centrifugado a 13000rpm por 6 min. O sobrenadante foi desprezado e foi adicionado ao pellet de DNA 500µl de etanol 100% (gelado) e 10% de solução de acetato de sódio 3M pH 5,2. Este material foi incubado a -70<sup>a</sup> C por 2 horas e depois centrifugado por 10min a 13000rpm. O sobrenadante foi desprezado e 500µl de etanol 70% (gelado) foi adicionado ao pellet de DNA, e este foi novamente centrifugado. Finalmente, foi adicionado ao pellet de DNA 25µl de solução de hidratação.

#### **3.4.2- DOSAGEM DO DNA**

Após a extração de DNA, as amostras foram dosadas em gel de agarose a 1% corados pelo brometo de etídio, o sistema utilizado foi o de minigel. Foram aplicados na primeira canaleta 1µl do padrão de quantificação de DNA (Low DNA Mass Ladder- Promega) e nas demais canaletas 3µl de cada amostra de DNA misturados a 3 µl do tampão de amostra 2X (0,125% de azul bromofenol, 0,125% de xilenocianol, e 15% de ficoll). O gel foi submetido a uma corrente de 80 volts, por aproximadamente 50 min em tampão de corrida TBE (0,89M de Tris, 0,02M de EDTA e 0,89M de Ácido bórico) Após a corrida, o gel foi examinado sob luz

ultravioleta e as concentrações das amostras de DNA foram estimadas pela comparação com o padrão de quantificação.

### **3.4.3- PROTOCOLO DA PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION)**

O DNA extraído de cada caramujo foi submetido à técnica de PCR conforme descrito por VIDIGAL ET AL. (2000). A reação foi realizada em tubos tipo eppendorf livre de RNase e DNase( AXYGEN) contendo aproximadamente 3-5 ng de DNA alvo juntamente com 200µM de cada um dos desoxirribonucleotídeos trifosfatos, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,8 unidade da Taq DNA polimerase, 50 pmoles de cada iniciador (ETTS1 e ETTS2), Tampão de PCR (50mM de KCl, 10mM de Tris-HCl pH 8,5) em um volume final de 10µl ajustado pela adição de água estéril. Todos os reagentes utilizados na PCR foram fornecidos pela Promega, exceto os iniciadores ETTS2 (5'-TAACAAGGTTTCCGTAGGTGAA-3') e ETTS1 (5'-TGCTTAAGTTCAGCGGGT-3') (KANE & ROLLISON, 1994)) que foram fabricados pela Invitrogen. Foi incluída uma amostra de controle negativo em todas as reações, que continha todos os reagentes na ausência do DNA alvo. As condições de amplificação utilizadas foram: desnaturação por 3 min à temperatura de 95° C, seguida de 32 ciclos de anelamento de 1 min a 54°C, extensão por 2 min a 72° C, desnaturação por 45 s a 95° C e finalmente extensão durante 5 min a 72° C.

#### **3.4.4- ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA 6%**

Após as reações, 3µl dos produtos de cada amplificação foram adicionados a 3µl de tampão de amostra e submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, em tampão de corrida TBE, usando-se o sistema de mini-gel (BIO-RAD). Os géis foram submetidos a uma corrente de 80 volts por aproximadamente 90 min a temperatura ambiente. Em seguida, esses géis foram corados pela prata, de acordo com o protocolo descrito por SANGUINETTI ET AL. (1994) para visualização do fragmento de 1.300 pares de base que foi amplificado pelos iniciadores ETTS1 e ETTS2. O tamanho das bandas foi determinado por comparação com um padrão de peso molecular (phiX-174)

#### **3.4.5- PROTOCOLO DA TÉCNICA RFLP (RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISMS)**

O fragmento obtido com os iniciadores ETTS1 e ETTS2, de aproximadamente 1.300 pb, foi submetido à restrição com a enzima *DdeI*. Para isto o restante do material amplificado (7µl) foi diluído em 63 µl de água estéril. Para a digestão foram utilizados 10 µl do produto de PCR diluído, 0,3 µl (4-8 unidades) da enzima *DdeI* (Promega) e 1 µl do tampão da enzima (Promega). O volume final da reação foi de 11,3 µl e a digestão se processou por 3:30 h à 37°C. Posteriormente, a enzima foi extraída de tubo com fenol/clorofórmio na proporção 1:1. Os perfis de restrição obtidos foram visualizados em gel de poliacrilamida (6%) corado pela prata, conforme detalhado anteriormente. O perfil espécie-específico esperado para *B.*

*tenagophila* é de dois fragmentos (800 e 470 pb). Para a linhagem Taim, além deste dois fragmentos, é esperado mais um de 350pb.

### **3.5- INTERAÇÃO *IN VITRO* ENTRE ESPOROCISTOS DE *S. mansoni*, HEMÓCITOS E HEMOLINFA DE *B. tenagophila* DAS LINHAGENS TAIM, JOINVILLE E SEUS DESENTENTES F1 E F2.**

#### **3.5.1- TRANSFORMAÇÃO DE MIRACÍDIOS DE *S. mansoni* EM ESPOROCISTOS *IN VITRO*.**

Hamsters (*Mesocricetus auratus*) infectados com 150 cercárias da cepa LE de *S. mansoni* foram sacrificados após 45 a 50 dias de infecção para obtenção de miracídios. Os fígados foram cirurgicamente removidos em ambiente asséptico e posteriormente processados em homogenizador de tecidos, previamente autoclavado. O homogenato foi transferido para um cálice de sedimentação, o mesmo foi tampado e colocado na geladeira por 20 minutos. O sobrenadante foi aspirado e o sedimento foi transferido para o balão volumétrico, envolto com papel alumínio. Um foco de luz artificial foi colocado na extremidade superior da boca do balão, de maneira que os miracídios na medida em que eclodissem fossem atraídos pela luz e concentrassem próximos à abertura do balão (CHAIA, 1956). Deste modo, os miracídios foram capturados com uma pipeta Pasteur e colocados em tubos cônicos mantidos em gelo e concentrados em um volume de 1 ml. A seguir, os miracídios foram ressuspensos em 15 ml de meio completo RPMI (meio de cultivo celular RPMI-1640 contendo 15mM HEPES, 24mM NaHCO<sub>3</sub>, 60 mg/L gentamicina e suplementado com 5% soro bovino) e incubados por 18 h a 27° C com 5% de CO<sub>2</sub> (SAMUELSON ET. AL., 1984). Após a transformação, confirmada pela perda do tegumento ciliado do miracídio, os esporocistos foram lavados com CBSS (Solução Salina Balanceada de Chernin - 47,7 mM de NaCl, 2,0 mM de KCl, 0,49 mM de Na<sub>2</sub>

HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM de MgSO<sub>4</sub> . 7H<sub>2</sub>O, 3,6 mM de CaCl<sub>2</sub> . 2 H<sub>2</sub>O, 0,59 mM de NaHCO<sub>3</sub>, 5,5 mM de glicose e 3 mM de trealose, pH 7.4) quantificados e utilizados para os testes *in vitro*.

### **3.5.2- OBTENÇÃO DE HEMOLINFA E HEMÓCITOS DOS CARAMUJOS PARENTAIS E SEUS DESCENDENTES**

Cerca de 100 caramujos adultos da geração F1, F2, *B. tenagophila* do Taim e *B. tenagophila* de Joinville e seus respectivos parentais foram utilizados para obtenção de hemolinfa. Antes da coleta da hemolinfa os caramujos foram submetidos a um procedimento de limpeza das conchas em solução a 0,1% de detergente (Limpol) seguida de desinfecção (inicialmente com solução de iodo 2% por 1 h seguido por 30 µg/ml de Gentamicina e 100 µg/ml de Ampicilina por 12 horas). Após as desinfecções os caramujos foram mantidos em água autoclavada. A coleta da hemolinfa foi realizada de acordo com o protocolo de ZELCK ET AL. (1995). Resumidamente, a concha de cada caramujo foi desinfetada com álcool 70° GL e seca com papel absorvente. Utilizando-se uma seringa plástica de 1ml (Plastipak) com agulha de 21G, a concha do molusco foi perfurada até atingir a região cardíaca. A hemolinfa de cada caramujo foi aspirada e transferida para tubos falcon de 15 ml mantidos no gelo, sendo recolhido um pool de hemolinfa para cada grupo experimental (Joinville, Taim, F1 e F2). O material recolhido (hemolinfa total) foi centrifugado (80 g por 10 min a 4°C) e o sobrenadante contendo a hemolinfa livre de células foi separada em novos tubos. Os hemócitos presentes no precipitado foram ressuspensos em CBSS sem glicose e trealose, contendo 1 % de albumina bovina, e o numero de células foi estimado utilizando câmara de Neubauer. Estas células foram mantidas em banho de gelo até o momento de uso. Os tubos

contendo a fração solúvel da hemolinfa foram novamente centrifugados (1200g/30 min/ 4° C) e o sobrenadante, denominado de plasma, foi recolhido e mantido em gelo até o momento do uso.

### **3.5.3- MORTALIDADE DE ESPOROCISTOS *IN VITRO***

Os componentes da hemolinfa total (hemócitos e/ ou plasma) das progêneses F1 e F2 e seus parentais foram avaliados quanto à sua capacidade de destruir esporocistos. Para isto hemócitos e/ou plasma de cada grupo de caramujos mais os esporocistos de *S. mansoni* axenicamente transformados foram distribuídos em placa de cultura de células com 96 poços. Como controle de sobrevivência do esporocisto às condições de cultivo *in vitro*, 50 esporocistos foram incubados, em triplicatas, em CBSS suplementado (Solução Salina Balanceada de Chernin contendo 10 mM de HEPES, 2 mM de glutamina, 1 mM de aminoácidos essenciais, 100 U de penicilina e 100 U de estreptomicina, e 1 % de albumina bovina). A influência da hemolinfa recolhida das linhagens parentais e seus descendentes na sobrevivência do parasito foi separadamente quantificado em placas de cultura contendo 50 esporocistos incubados com CBSS suplementado e 50 µl de plasma ou  $1 \times 10^5$  hemócitos ou ambos (50 µl de plasma junto com  $1 \times 10^5$  hemócitos obtidos da mesma linhagem ou geração de caramujo). Cada tratamento foi testado em triplicata e o volume total em cada poço da placa foi completado para 250 µl com CBSS suplementado. A placa foi incubada por 6 h a 27°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após o período de incubação, foi verificada a viabilidade dos esporocistos através da adição de 20 µl de solução de 0,4% de Azul de Tripán (corante vital). Todos os esporocistos presentes nos poços foram contados antes e após a incubação e os que

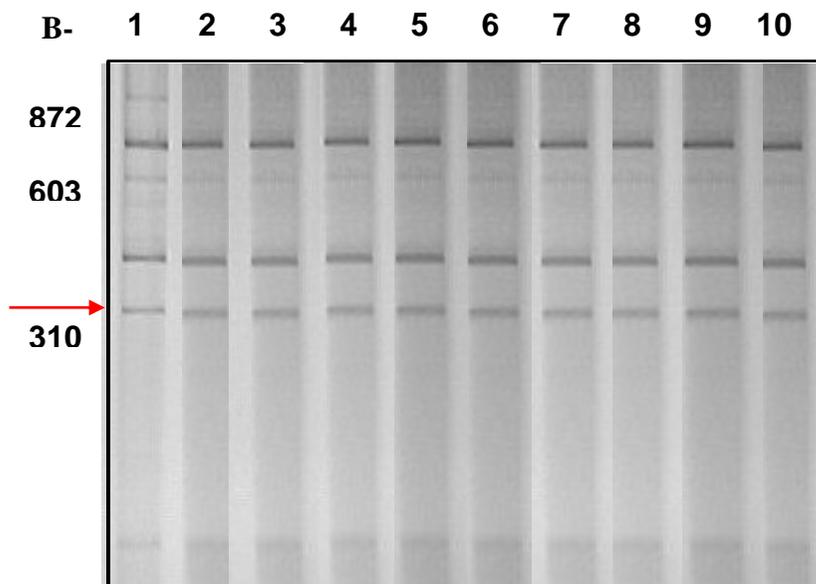
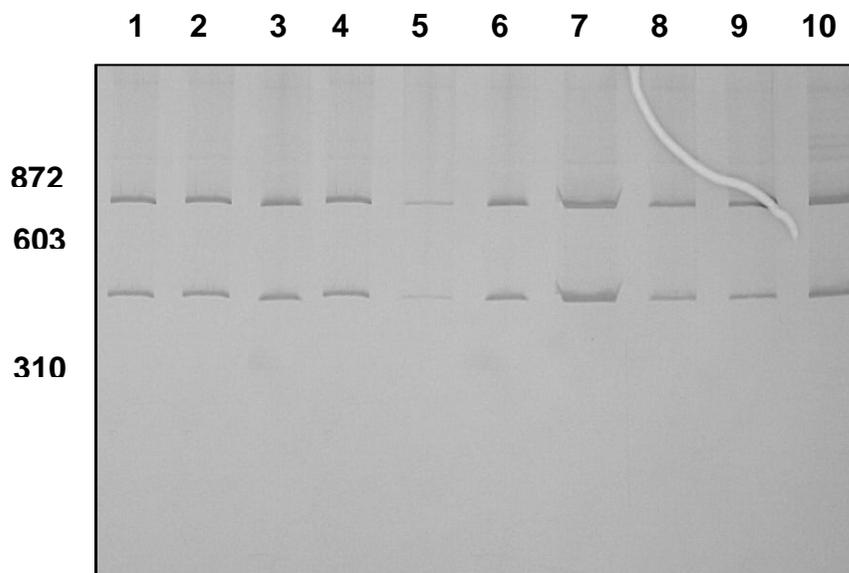
apresentaram corados foram considerados mortos. Posteriormente, a taxa de sobrevivência dos esporocistos foi calculada em relação ao grupo controle.

#### **3.5.4- ANÁLISE ESTATÍSTICA**

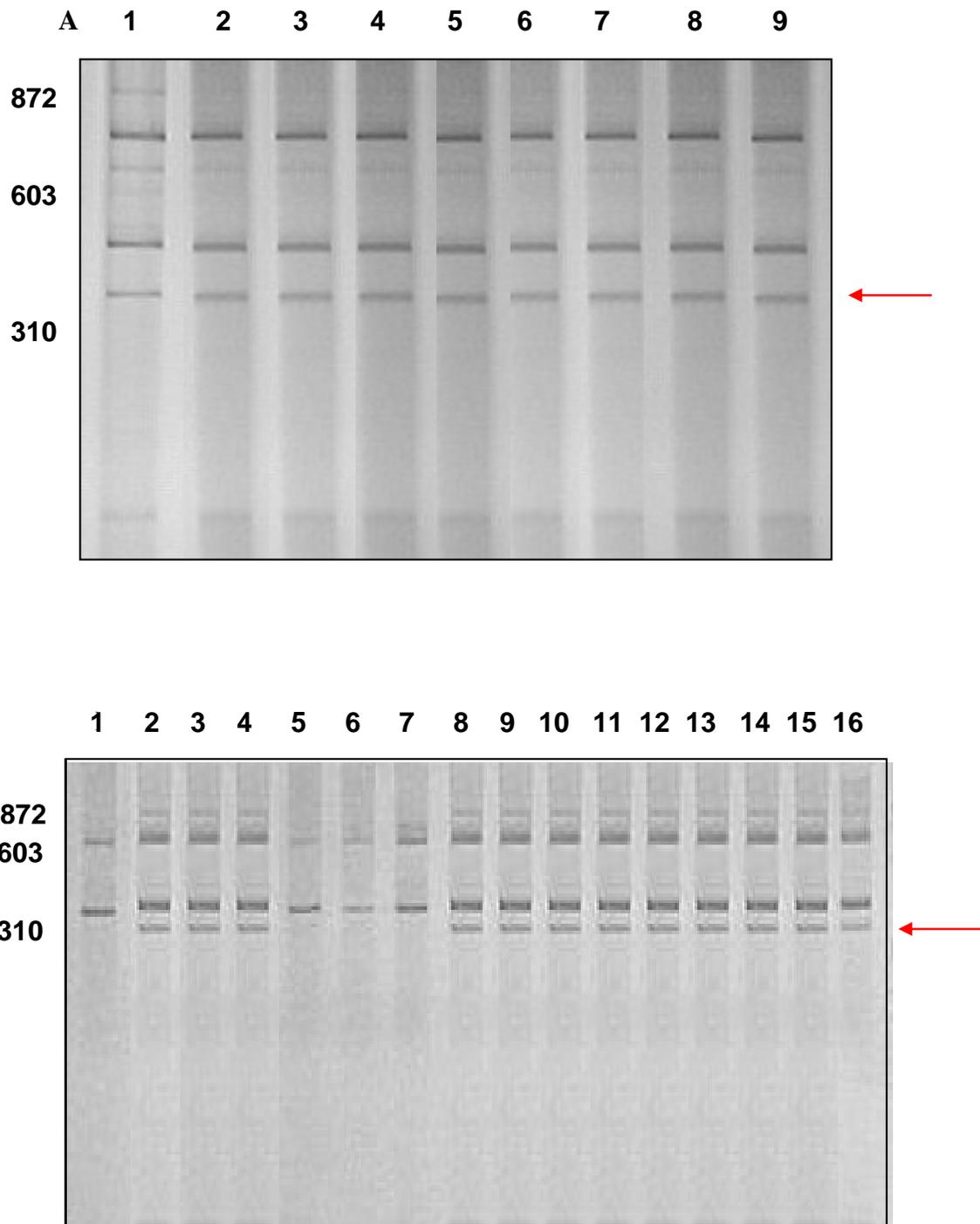
Os resultados obtidos em cada grupo foram estatisticamente comparados, utilizando-se análise de variância para dados paramétricos (ANOVA, post teste Turkey). Valores de  $P \leq 0.05$  foram considerados estatisticamente diferentes

#### 4- RESULTADOS

O perfil de restrição obtido com a enzima *Ddel* sobre o fragmento de 1300 bp amplificado das amostras de DNA de *B. tenagophila* dos diferentes grupos experimentais, encontram-se nas figuras 2 e 3. Conforme esperado, todos os exemplares da linhagem parental *B. tenagophila* de Joinville apresentaram os dois fragmentos típicos de *B. tenagophila*, isto é os fragmentos de 800 e 470pb (Figura 2A). Os exemplares da linhagem parental *B. tenagophila* do Taim mostraram um perfil de restrição composto por três fragmentos de DNA: os dois fragmentos típicos de *B. tenagophila*, com 800 e 470 pb, além do fragmento de 350pb (Figura 2B). Na geração F1, todos os exemplares testados apresentaram o mesmo perfil de restrição observado nos indivíduos parentais *B. tenagophila* do Taim, com os três fragmentos de DNA (Figura 3A). Dos 16 exemplares da geração F2 testados, 12 indivíduos mostraram perfil de restrição composto por três fragmentos de DNA (800, 470 e 350 pb) e os 4 indivíduos restantes tiveram perfil de restrição composto pelos dois fragmentos, típicos do perfil de *B. tenagophila* (Figura 3B). Os resultados deste experimento já foram publicados por ROSA ET AL. (2004) (Anexos).



**Figura 2-Perfis de restrição do fragmento de 1300 pb de *B. tenagophila*, após a digestão com a enzima *Ddel*, em gel de poliacrilamida 6% corado pela prata. A) canaletas de 1-10 indicam o perfil de restrição da população *B. tenagophila* de Joinville (800 e 470 pares de base). B) canaletas de 1-10 indicam o perfil de restrição da população *B. tenagophila* do Taim (800, 470 e 350 pares de base). A seta indica o fragmento de 350 pb típico desta linhagem. Os valores à esquerda do gel correspondem ao peso molecular.**

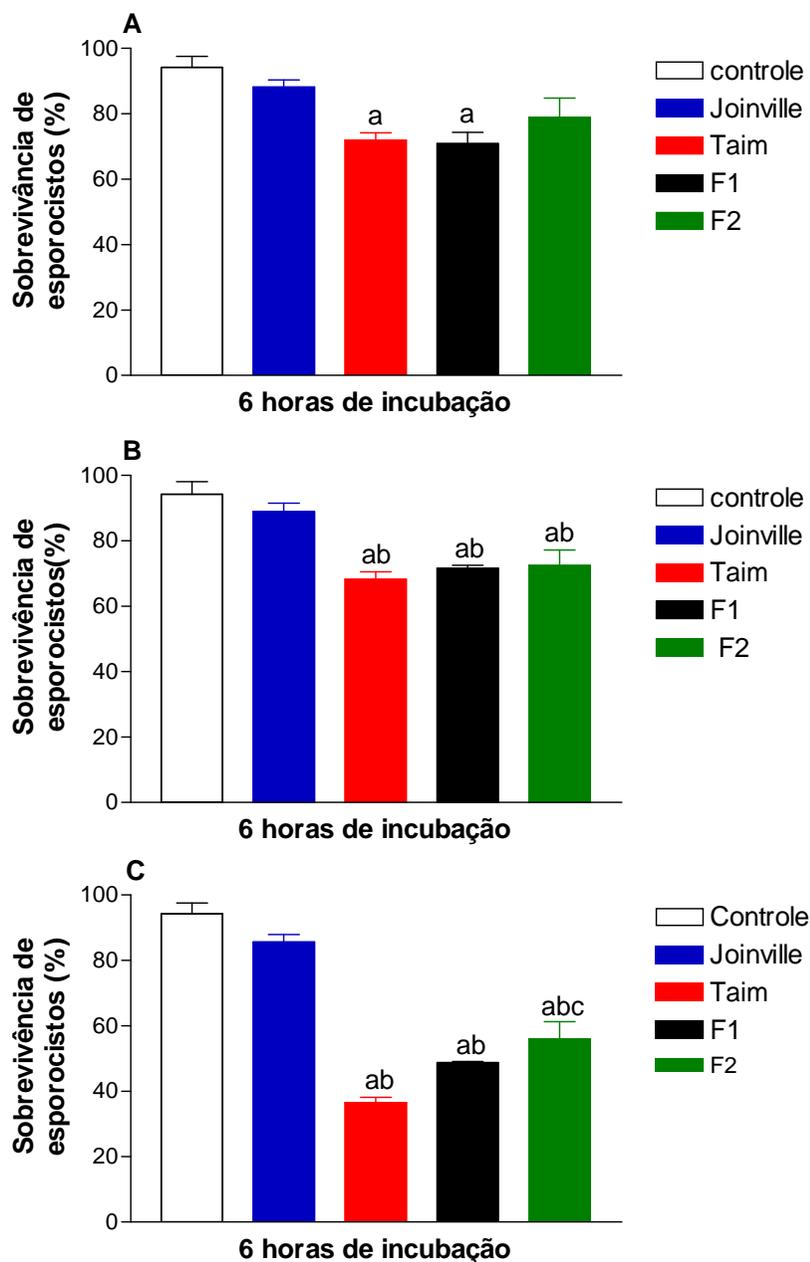


**Figura 3-Perfis de restrição do fragmento de 1300 pb de *B. tenagophila*, após a digestão com a enzima *Ddel*, em gel de poliacrilamida 6% corado pela prata A) Canaletas de 1-9 indicam o perfil de restrição dos indivíduos F1. B) Canaletas de 1-16 indicam o perfil de restrição dos indivíduos F2 . As setas indicam o fragmento de 350 pares de base, típico da população *B. tenagophila* do Taim. Os valores à esquerda do gel correspondem ao peso molecular.**

A influência dos fatores solúveis da hemolinfa de *B. tenagophila* do Taim, *B. tenagophila* de Joinville e seus descendentes sobre a taxa de sobrevivência dos esporocistos de *S. mansoni* estão representados na Figura 4A. Os resultados mostram que os esporocistos mantidos nas condições de cultivo (grupo controle, sem os fatores solúveis da hemolinfa) apresentaram taxa de sobrevivência de 94 %, após 6 horas de incubação. A adição de fatores solúveis da hemolinfa de *B. tenagophila* de Joinville na cultura de esporocistos não alterou significativamente a sua taxa de sobrevivência, pois 88 % dos esporocistos permaneceram vivos. Entretanto, a incubação de esporocistos de *S. mansoni* com os fatores solúveis de *B. tenagophila* do Taim, resultou em redução significativa da taxa de sobrevivência do parasito, quando comparado com o grupo controle ( $72 \% \pm 3,9; P < 0,01$ ). Também foi observado redução significativa em relação ao grupo controle quando os esporocistos foram cultivados na presença dos fatores solúveis da hemolinfa dos caramujos F1 ( $71\% \pm 6,0, P < 0,01$ ), mas não na presença de caramujos F2 ( $78,0 \% \pm 10, P > 0,05$ )

O outro elemento do sistema interno de defesa analisado foram os hemócitos (Figura 4B). Conforme apresentado anteriormente, a taxa de sobrevivência dos esporocistos cultivados na ausência de células foi de 94 %, após 6 horas de incubação. Na presença de hemócitos circulantes da hemolinfa de *B. tenagophila* de Joinville não houve uma mortalidade significativa dos esporocistos, entretanto, quando cultivados na presença de hemócitos de *B. tenagophila* do Taim apresentaram redução significativa da taxa de sobrevivência ( $68 \% \pm 3,9$ ) tanto em relação ao grupo controle ( $P < 0,01$ ) quanto ao grupo suscetível *B. tenagophila* de Joinville ( $P < 0,05$ ) As taxas de sobrevivência dos esporocistos cultivados com os hemócitos dos descendentes F1 e F2 foram respectivamente de 72 e 73 %, taxa significativamente menor do que a obtida no grupo controle bem como no grupo Joinville ( $P < 0,05$ ).

Conforme demonstrado na Figura 4C, mesmo com a adição conjunta de hemócitos e fatores solúveis da hemolinfa de caramujos da linhagem Joinville a taxa de sobrevivência dos esporocistos permaneceu elevada. Em contraste, a adição conjunta de hemócitos e fatores solúveis da hemolinfa de *B. tenagophila* da linhagem Taim resultaram em uma intensa redução da taxa de sobrevivência dos esporocistos ( $36 \pm 2,7$ ) quando comparado com o grupo controle e grupo Joinville ( $P < 0,001$ ). A adição dos fatores solúveis da hemolinfa e hemócitos dos descendentes F1 na cultura de esporocistos também resultou em uma redução significativa da taxa de sobrevivência do parasito quando comparado com o grupo controle e o grupo *B. tenagophila* de Joinville ( $49\% \pm 0,5$ ,  $P < 0,001$ ). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre esse grupo e o grupo tratado com elementos do caramujo Taim. As culturas de esporocistos que receberam os fatores solúveis da hemolinfa e hemócitos dos descendentes F2 também mostraram uma redução significativa da taxa de sobrevivência do parasito ( $56\% \pm 9,21$ ,  $P < 0,001$ ) em relação ao grupo controle ou ao grupo experimental Joinville. Apesar do grupo F2 ser capaz de reduzir a taxa de sobrevivência dos esporocistos de *S. mansoni*, foi observado que estes valores são estatisticamente maiores do que os obtidos pelo grupo do caramujo *B. tenagophila* do Taim ( $P < 0,05$ ).



**Figura 4- Taxa de sobrevivência de esporocistos de *S. mansoni* cultivados na presença de hemócitos e/ou fatores solúveis da hemolinfa de *B. tenagophila* do Taim, *B. tenagophila* de Joinville, F1 e F2** A) Efeito da adição dos fatores solúveis da hemolinfa A letra **a**: indica diferenças estatisticamente significativas quando comparada com o grupo controle ( $P < 0,01$ ) (B) Efeito da adição de hemócitos A letra **a**: Indica diferenças estatisticamente significativas quando comparada com o grupo controle ( $P < 0,01$ ) e a letra **b**: indica diferenças estatisticamente significativas quando comparada com o grupo Joinville ( $P < 0,05$ ) (C) Efeito da adição conjunta dos fatores solúveis da hemolinfa e hemócitos. A letra **a**: Indica diferenças estatisticamente significativas quando comparada com o grupo controle ( $P < 0,001$ ). A letra **b**: indica diferenças estatisticamente significativas quando comparada com o grupo Joinville ( $P < 0,001$ ). A letra **c**: Indica diferenças estatísticas quando comparado com o grupo Taim ( $P < 0,05$ ).

## 5- DISCUSSÃO

A técnica PCR\_RFLP (Polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism) foi utilizada com êxito na identificação molecular das espécies brasileiras do gênero *Biomphalaria* (VIDIGAL ET AL., 1998; CALDEIRA ET AL., 1998; VIDIGAL ET AL., 2000). Os autores amplificaram a região espaçadora interna do gene do RNA, constituído por três regiões conservadas 18S, 5.8 S e 28S e 2 regiões espaçadoras (ITS1 e ITS2). Os iniciadores anelam-se na porção final da região 18S e na inicial da 28S gerando um fragmento de aproximadamente 1300 pares de base. Posteriormente, este fragmento foi cortado com enzimas de restrição, gerando perfis espécie-específicos. O perfil molecular das populações de *B. tenagophila* do Brasil possui dois fragmentos (800 e 470 pb). Entretanto, BARBOSA (2001) identificou por meio desta técnica que a população *B. tenagophila* do Taim apresenta um perfil com três fragmentos (800, 470 e 350 pb), diferindo das demais populações de *B. tenagophila*.

Neste presente estudo, um dos objetivos propostos foi identificar se o fragmento de 350 pares de base típico da linhagem do Taim apresentava caráter dominante. Ao analisar o perfil molecular das progênies F1 e F2 obtidas do cruzamento entre *B. tenagophila* do Taim (resistente) e *B. tenagophila* de Joinville (suscetível), observou-se que o fragmento de 350 pb estava presente em 100% dos descendentes F1 e em 75% dos indivíduos F2 testados. Este padrão sugere que esse marcador possui caráter dominante com segregação tipicamente mendeliana. Esta banda, apesar de não relacionada com a resistência à infecção observada na linhagem de *B. tenagophila* do Taim, constitui um marcador genético importante, que será de grande utilidade no monitoramento das áreas onde essa linhagem está sendo introduzida.

Estudos recentes mostraram que os indivíduos da progênie F1 obtidos do cruzamento entre *B. tenagophila* do Taim e *B. tenagophila* de Joinville foram 100% resistente ao *S. mansoni* e os indivíduos F2 apresentaram níveis de suscetibilidade de 5,3 a 8 % ao parasito. Tudo indica que o caráter resistência desta linhagem está associado a dois genes dominantes (ROSA ET AL., 2005). Para verificar o caráter da resistência de *B. tenagophila* do Taim, transmitido aos seus descendentes, estava associado ao sistema interno de defesa, os fatores solúveis da hemolinfa e hemócitos das progênie e seus progenitores foram avaliados.

Neste trabalho, os fatores solúveis da hemolinfa da linhagem *B. tenagophila* do Taim foram capazes de destruir diretamente parte dos esporocistos de *S. mansoni*. Por outro lado, a adição dos fatores solúveis da hemolinfa da linhagem suscetível *B. tenagophila* de Joinville não foi eficiente na destruição do parasito, pois as taxas de sobrevivência dos esporocistos foram elevadas. Os resultados referentes a linhagem resistente corroboram os dados obtidos por PEREIRA ET AL (2008), pois estes autores demonstraram que os fatores solúveis da hemolinfa da linhagem do Taim produzem a destruição dos esporocistos de *S. mansoni in vitro*, e isto pode estar associado a resistência desta linhagem à infecção por *S. mansoni*. Com relação aos fatores solúveis da hemolinfa da progênie F1, foi observado que este grupo mostrou-se bem semelhante ao grupo parental *B. tenagophila* do Taim, ou seja induz a destruição de esporocistos. A presença dos fatores solúveis da hemolinfa da progênie F2 também foi capaz de reduzir o número de esporocistos após 6 h de incubação, entretanto esta diminuição não foi tão intensa como nos grupos Taim e F1. A importância dos fatores solúveis da hemolinfa de linhagens resistentes de caramujos no processo de destruição do parasito foi anteriormente demonstrada tanto experimentos *in vivo*, através da transferência dos fatores solúveis de linhagens resistentes para linhagens suscetíveis (GRANATH & YOSHINO, 1984; MARTINS-SOUZA, 1999; BEZERRA & COELHO, 2006.; NEGRÃO-CORREA ET AL.;

2007; PEREIRA ET AL., 2008) como em testes *in vitro* (BAYNE ET AL., 1988; PEREIRA ET AL., 2008). Nossos dados indicam que fatores solúveis da hemolinfa envolvidos na destruição direta de esporocistos de *S. mansoni* encontrados na linhagem de *B. tenagophila* do Taim são transmitidos para os seus descendentes durante os cruzamentos com linhagens suscetíveis. Como este efeito é observado mesmo na ausência de hemócitos, acredita-se que componentes solúveis da hemolinfa dos descendentes F1 e até F2 podem ser diretamente tóxicos ou lesivos ao tegumento, de maneira semelhante ao proposto para a linhagem resistente parental.

O principal elemento do sistema interno de defesa dos moluscos são os hemócitos e trabalhos anteriores têm demonstrado a importância dos hemócitos circulantes de *B. tenagophila* da linhagem do Taim no mecanismo de resistência à infecção por *S. mansoni* (BARBOSA ET AL., 2006; MANTINS-SOUZA,1999). A participação dos hemócitos de *B. tenagophila* do Taim na destruição de esporocistos de *S. mansoni* foi confirmada em testes realizados *in vitro* (MANTINS-SOUZA,1999, PEREIRA ET AL., 2008), onde a adição destas células nas culturas contendo esporocistos axenicamente transformados resultou em elevada mortalidade do parasito. Os dados aqui apresentados confirmam que hemócitos da linhagem resistente *B. tenagophila* do Taim induzem redução significativa das taxas de sobrevivência dos esporocistos. Ao contrário da linhagem resistente, as taxas de sobrevivência dos esporocistos de *S. mansoni* permaneceram elevadas e semelhantes ao controle quando incubados com os hemócitos da linhagem suscetível *B. tenagophila* de Joinville. Mais uma vez, a adição de hemócitos purificados da progênie F1e F2 ao meio de cultura contendo esporocistos resultou em aumento de mortalidade do parasito, semelhante ao detectado com adição de hemócitos do parental resistente. O aumento de destruição destes parasitos foi acompanhado por encapsulamento das larvas por hemócitos de caramujos resistentes e de seus

descendentes. Os dados corroboram com a participação de elementos celulares de *Biomphalaria* de linhagens resistentes na reação à infecção pelo *S. mansoni* e outros trematódeos, que foi descrito inicialmente por estudos histológicos, nos quais foi evidenciada intensa concentração celular ao redor do miracídio recém penetrado (NEWTON, 1952; BROOKS, 1953; COELHO E BARBOSA, 1956; COELHO, 1957; LIE ET AL., 1987; GUARALDO ET AL, 1981).

A adição combinada de hemócitos com os fatores solúveis da hemolinfa coletados da linhagem *B. tenagophila* do Taim no meio de cultura contendo esporocistos de *S. mansoni* resulta em aumento da mortalidade das larvas do parasito, sugerindo um efeito sinérgico entre as células e alguns componentes dos fatores solúveis da hemolinfa no processo de reconhecimento do parasito e/ou ativação dos hemócitos. Os resultados obtidos com a linhagem resistente foram bem semelhantes aos descritos por MARTINS-SOUZA (1999). Entretanto, a adição combinada de hemócitos e plasma coletados de *B. tenagophila* da linhagem parental Joinville (altamente suscetível à infecção) ao meio de cultura contendo esporocistos não foram suficientes para reduzir a sobrevivência dos mesmos, confirmando, *in vitro*, a ineficiência dos elementos do sistema inato de defesa desta linhagem de caramujo em destruir larvas do parasito. De maneira interessante, hemócitos e fatores solúveis da hemolinfa coletados da progênie F1, resultante do cruzamento da linhagem do Taim com Joinville, também resultou em redução significativa das taxas de sobrevivência dos esporocistos, pois apenas 50% destes permaneceram vivos. Os resultados obtidos com hemócitos e fatores solúveis da hemolinfa coletados dos indivíduos F2 mostraram que a taxa de sobrevivência dos esporocistos foi reduzida para 56%.

Os mecanismos responsáveis pela destruição do esporocisto de *S. mansoni* por componentes da hemolinfa de linhagens *B. glabrata* ou *B. tenagophila* resistentes ainda não

estão completamente estabelecidos. Nossos dados mostram que no caso de *B. tenagophila* da linhagem do Taim e dos seus descendentes, há elementos solúveis que atuam diretamente sobre o parasito e indiretamente aumentando a capacidade de destruição dos hemócitos circulantes. Trabalhos anteriores (BAYNE ET AL., 1980; PEREIRA ET AL., 2008) sugerem que fatores solúveis da hemolinfa de *Biomphalaria* de linhagens resistentes ao parasito possam atuar indiretamente, aumentando a opsonização do parasito ou ativando os hemócitos, pois hemócitos de linhagens suscetíveis associados à fatores solúveis da hemolinfa de linhagens resistentes adquirem a capacidade de destruir os esporocistos de *S. mansoni*. Portanto, podemos especular que na hemolinfa (fração acelular) da linhagem *B. tenagophila* do Taim não possui um único fator responsável pela morte do *S. mansoni*. Provavelmente há um fator que pode agir diretamente, sem a participação dos hemócitos, enquanto o outro fator opsoniza o parasito e os hemócitos ativados acabam destruindo as larvas.

Em suma ao analisar o efeito dos componentes do sistema interno de defesa das linhagens parentais e suas respectivas progênes, podemos concluir que a resistência natural à infecção por *S. mansoni* observada em *B. tenagophila* da linhagem do Taim está associada a capacidade dos hemócitos circulantes juntamente com o fatores solúveis da hemolinfa destes caramujos em destruírem as larvas do parasito, habilidade esta que não é observada com hemócitos e hemolinfa da linhagem suscetível. De maneira relevante, nossos dados confirmam que nas progênes do cruzamento da linhagem resistente com a suscetível a resistência à infecção por *S. mansoni* detectada *in vivo* foi acompanhada pelo aumento da capacidade de destruição dos esporocistos pelos hemócitos e hemolinfa *in vitro*. Estes dados indicam que o caráter da resistência à infecção por *S. mansoni* transmitida aos descendentes está associada a genes que controlam o funcionamento de elementos do sistema interno de defesa dos moluscos hospedeiros.

Parte 2-Transmissão do caráter resistência da população *B. tenagophila* do Taim quando mantido em diferentes proporções com a população suscetível *B. tenagophila* de Joinville, submetidos ou não à pressão do parasito.

## **6- MATERIAL E MÉTODOS**

### **6.1- CARAMUJOS**

Foram utilizados para este estudo caramujos da linhagem *B. tenagophila* do Taim e *B. tenagophila* de Joinville.

### **6.2- PARASITOS**

A cepa de *S. mansoni* utilizada neste experimento foi a LE .

### **6.3- INFECCÃO DE CARAMUJOS**

Hamsters infectados com a cepa LE e com 50 dias de infecção foram utilizados para obtenção de miracídios conforme descrito por CHAIA (1956) e já detalhado anteriormente.

### **6.4- AVALIAÇÃO DA INFECCÃO**

A suscetibilidade dos caramujos experimentalmente infectados por *S. mansoni* foi avaliada pela observação de cercárias eliminadas conforme descrito por PELLEGRINO & MACEDO (1955). Resumidamente, a partir dos 30 dias da infecção, os caramujos foram individualmente colocados em recipientes apropriados, juntamente com água desclorada e expostos a luz artificial durante aproximadamente 4 h para estimular a eliminação de cercárias. Após este período cada recipiente foi examinado sob microscópio estereoscópio para verificação

da presença ou não de cercárias. Este procedimento foi realizado semanalmente entre 30 a 90 dias de infecção.

## 6.5- MONTAGEM DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram montados dez grupos parentais de *B. tenagophila* com 50 indivíduos jovens cada, medindo 3-4 mm de diâmetro de concha. Os grupos de caramujos foram colocados, ainda jovens, dentro de cubas de plástico de 50 x 16 x 33 com aproximadamente 28 L de água desclorada e alimentados com alface e ração. Os grupos foram mantidos no moluscário a uma temperatura entre 26°C-28 °C.

Um grupo foi formado apenas com a população pigmentada *B. tenagophila* do Taim (resistente) e outro somente com a população albina *B. tenagophila* de Joinville (suscetível), os demais grupos foram constituídos por uma mistura de indivíduos da linhagem Taim e Joinville diferindo apenas na proporção entre resistentes e suscetíveis. Especificamente, os grupos experimentais apresentavam as seguintes proporções: **Grupo 1:** 50 caramujos *B. tenagophila* do Taim (R), **Grupo 2:** 50 caramujos albinos *B. tenagophila* de Joinville (S), **Grupo 3:** 25 caramujos *B. tenagophila* do Taim (R) e 25 caramujos albinos *B. tenagophila* de Joinville (S), **Grupo 4:** 10 caramujos *B. tenagophila* do Taim (R) e 40 caramujos albinos *B. tenagophila* de Joinville (S), **Grupo 5:** 40 caramujos *B. tenagophila* do Taim (R) e 10 caramujos albinos *B. tenagophila* de Joinville (S). Os grupos de 1 a 5 foram mantidos não infectados durante todo o período de análise. Os grupos 6, 7, 8, 9 e 10 foram montados exatamente como descritos para os grupos 1-5, mantendo as mesmas proporções de caramujos resistentes e suscetíveis, porém estes grupos foram expostos a cepa LE de *S. mansoni*. Como o objetivo deste experimento foi avaliar o efeito da pressão do parasito sobre as populações

resistente e suscetível de *B. tenagophila*, foi estabelecido que os grupos (6-10) seriam infectados semanalmente com uma elevada carga parasitária (200 miracidios/grupo) durante um período de dois meses. Após a obtenção e quantificação dos miracidios, estes foram colocados nas cubas de plástico que continham os caramujos. Os moluscos foram infectados somente após a maturação sexual (início das posturas). Para verificar o efeito do *S. mansoni* nos grupos experimentais, as taxas de sobrevivência e os parâmetros de fecundidade de cada grupo foram analisados durante dez semanas, conforme detalhado a seguir. A composição dos grupos está esquematizada na tabela 1.

Para obtenção da geração F2, foram selecionados 50 indivíduos F1 jovens pigmentados de cada grupo experimental. Sendo assim, foram montados dez novos grupos com indivíduos F1 onde permaneceram até alcançarem a maturidade sexual e conseqüentemente gerar indivíduos F2. Finalmente, outros 10 grupos com 50 indivíduos F2 foram montados para dar continuidade à geração F3. As análises e os procedimentos adotados para a obtenção da geração F2 e F3 foram os mesmos utilizados pelos grupos parentais.

**Tabela 1- Desenho esquemático dos grupos parentais utilizados no experimento, submetidos ou não à pressão do *S. mansoni*.**

Grupos não infectados	Grupos infectados
GI- 50R	G6- 50R
G2- 50S	G7- 50S
G3- 25R+25S	G8- 25R+25S
G4- 40S+10R	G9- 40S+10R
G5- 40R+10S	G10-40R+10S

R= População resistente *B. tenagophila* do Taim (Pigmentado)  
 S= População suscetível *B. tenagophila* de Joinville (Albina)

## **6.6- TAXAS DE SOBREVIVÊNCIA DOS ADULTOS**

Assim que se iniciaram as infecções com os miracidios de *S. mansoni*, o número de indivíduos adultos sobreviventes de cada grupo infectado (6-10) e não infectado (1-5) foram anotados semanalmente, durante 10 semanas consecutivas e posteriormente curvas de sobrevivência foram construídas com os dados obtidos.

## **6.7- PARÂMETROS DE FECUNDIDADE E ANÁLISE ESTATÍSTICA**

A fecundidade dos diferentes grupos experimentais na geração parental, F1 e F2 foram avaliados através da quantificação semanal do número de ovos/ desova e ovos/caramujo em cada grupo experimental. Para tanto, após o início das infecções, várias placas de isopor foram colocadas em cada cuba experimental para coletar as desovas de cada grupo. Os caramujos depositavam suas massas de ovos sobre as placas de isopor que eram retiradas e substituídas por outras a cada semana. O número de ovos/desovas foi quantificado sob microscópio estereoscópico, durante dez semanas consecutivas e posteriormente o número de ovos/caramujo produzidos por cada grupo foi calculado, considerando-se o número de caramujos sobreviventes em cada grupo durante a semana examinada.

Depois de quantificadas, as desovas obtidas dos seus respectivos grupos experimentais foram transferidas para uma nova cuba para que os caramujos pudessem eclodir e dar prosseguimento a uma nova geração. O número total de indivíduos sobreviventes após 30 dias de eclosão das gerações F1, F2 e F3 de cada grupo experimental bem como a proporção entre albinos e pigmentados foram contados. Os resultados referentes aos parâmetros de fecundidade obtidos em cada grupo experimental não infectado e infectado foram

estatisticamente comparados, utilizando-se Teste t para (dados paramétricos). Os valores de  $P \leq 0.05$  foram considerados estatisticamente diferentes.

### **6.8- TESTE DE SUSCETIBILIDADE DAS PROGÊNIES F1, F2 E F3**

Para avaliar os níveis de suscetibilidade das progênies obtidas do cruzamento entre *B. tenagophila* do Taim e *B. tenagophila* Joinville, 50 exemplares jovens (5-7 mm de diâmetro) de cada grupo experimental e de cada geração (F1, F2 e F3) foram expostos individualmente a 30 miracídios da cepa LE de *S. mansoni*. Estudos prévios demonstraram que esta carga parasitária era ideal para analisar o fenótipo resistência nos indivíduos das progênies F1, F2, F3. Entre 30 e 90 dias de infecção os caramujos foram examinados semanalmente, após exposição à luz artificial por 4 h, para constatação da presença de cercárias do parasito.

## 7- RESULTADOS

### 7.1- PROPORÇÃO ENTRE ALBINOS E PIGMENTADOS

Os intercruzamentos entre as populações resistente e suscetível de *B. tenagophila* foram confirmados pela pigmentação das progêneses F1 e F2 (Tabela 2). De acordo com os dados obtidos, em todos os grupos a proporção de indivíduos F1 pigmentados foi superior ao número de caramujos F1 albinos e este foi o primeiro indício de que ocorreu o intercruzamento entre estas duas populações. O cruzamento entre indivíduos F1 gerou a progênie F2; e ao analisar o fenótipo desses caramujos, foi constatado o surgimento de exemplares albinos. A proporção de indivíduos albinos principalmente nos grupos 3, 4, 8 e 9 foi próxima a 25%. Estes números reafirmam a ocorrência do intercruzamento entre a população parental albina de *B. tenagophila* de Joinville (suscetível) e a população pigmentada *B. tenagophila* do Taim (resistente), visto que os indivíduos F1 que foram selecionados para a obtenção dos descendentes F2 foram todos pigmentados.

**Tabela 2 - Percentagem entre caramujos albinos e pigmentados obtidos do cruzamento entre *B. tenagophila* resistente (pigmentada) e suscetível (albina)**

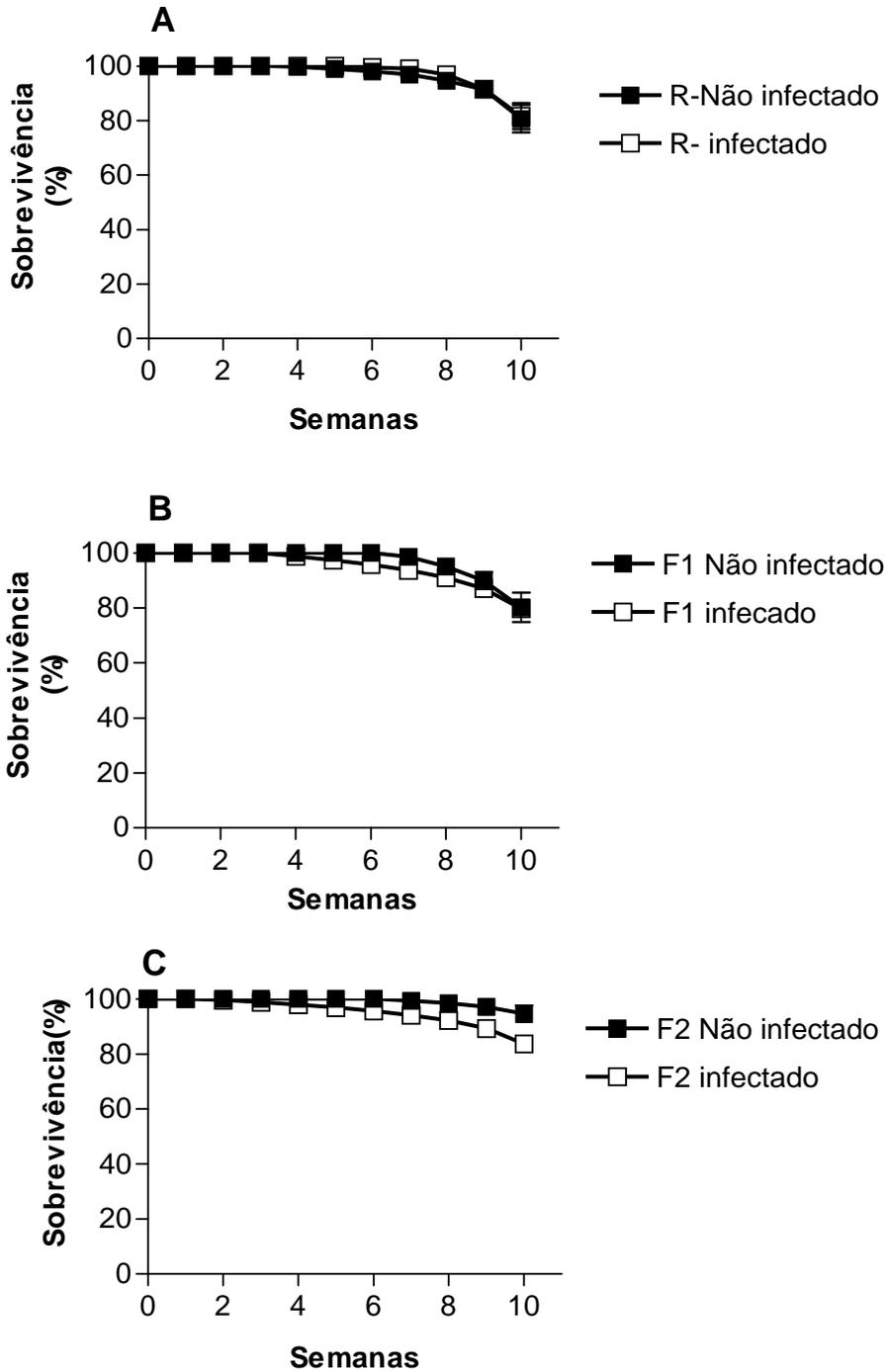
Grupos	Fenótipos dos indivíduos F1 (%)	Fenótipos dos indivíduos F2 (%)
G1-50R	100 pigmentados	100 pigmentados
G2-50S	100 albinos	100 albinos
G3- 25R+25S	90 pigmentados e 10 albinos	75 pigmentados e 25 albinos
G4-40S+10R	70 pigmentados e 30 albinos	80 pigmentados e 20 albinos
G5-40R+10S	99 pigmentados e 1 albino	86 pigmentados e 14 albinos
G6-50R	100 pigmentados	100 pigmentados
G7-50S	100 albinos	100 albinos
G8- 25R+25S	97 pigmentados e 3 albinos	79 pigmentados e 21 albinos
G9-40S+10R	87 pigmentados e 13 albinos	81 pigmentados e 19 albinos
G10-40R+10S	100 pigmentados	85 pigmentados e 15 albinos

## **7.2- EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO *S. mansoni* NAS POPULAÇÕES SUSCETÍVEIS E RESISTENTES DE *B. tenagophila* QUANDO ISOLADAS.**

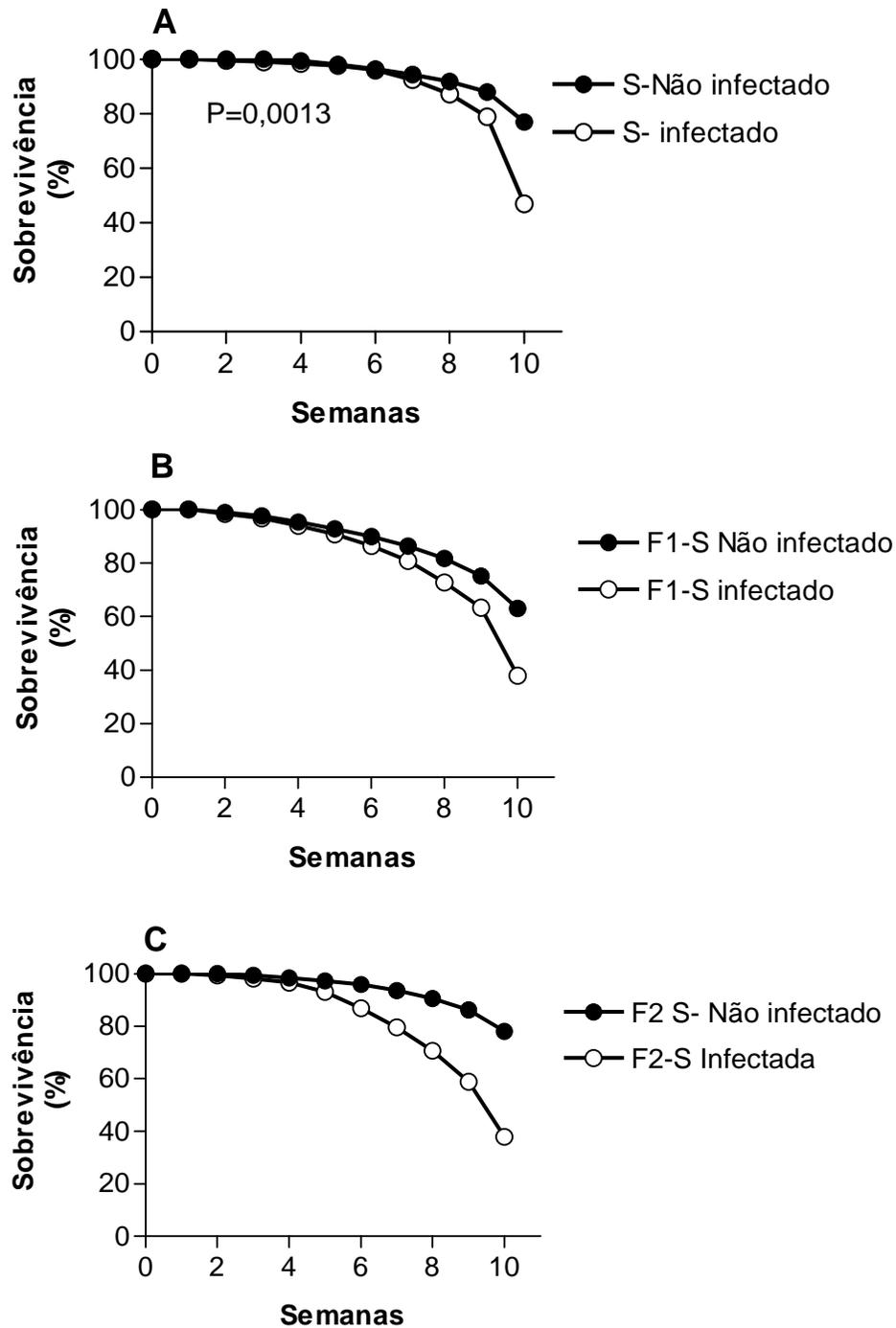
Ao analisar as curvas de sobrevivência da população parental *B. tenagophila* do Taim foi observado que 80% dos indivíduos não infectados (Grupo 1) e infectados (Grupo 6) foram capazes de sobreviver, durante o período de 10 semanas (Figura 5A). Os indivíduos F1 (Figura 5B) e F2 (Figura 5C) provenientes de populações resistentes também mostraram elevadas taxas de sobrevivência, independentemente da exposição ao parasito. Os dados indicam que a infecção por *S. mansoni* não exerceu uma pressão seletiva na população isolada de *B. tenagophila* da linhagem do Taim ou em seus descendentes, pois não houve diferenças estatisticamente significativa entre a população resistente não infectada e infectada ( $P > 0,05$ ).

As curvas de sobrevivência referente à população parental *B. tenagophila* de Joinville indicam que 76% dos indivíduos permaneceram vivos durante o período de avaliação, quando não expostos ao *S. mansoni*. Por outro lado, apenas 46% dos caramujos conseguiram sobreviver quando infectados, sendo que a diferença das curvas de sobrevivência dos animais infectados e não infectados foi estatisticamente significativa ( $P=0,0013$ ) (Figura 6A). Resultados semelhantes também foram observados com os descendentes F1 e F2 deste grupo experimental. Assim, as curvas de sobrevivência dos indivíduos F1, obtidos de populações suscetíveis, mostraram que 63% desses caramujos permaneceram vivos quando não infectados. Este valor foi significativamente reduzido para 37% quando exposto ao parasito ( $P=0,0011$ ) (Figura 6B). De maneira semelhante a taxa de sobrevivência dos indivíduos da progênie F2 infectados (37%) foi estatisticamente menor ( $P < 0,0001$ ) do que os não infectados (78%) (Figura 6C). De acordo com os resultados obtidos, a população suscetível e seus descendentes F1 e F2 apresentaram uma redução significativa no número de indivíduos

quando expostos ao *S. mansoni*, confirmando a pressão do parasitismo na sobrevivência dos caramujos suscetíveis.



**Figura 5: Curvas de sobrevivência da população *B. tenagophila* do Taim (R) e seus descendentes mantidos durante 10 semanas com exposição frequente à miracídios de *S. mansoni* (infectados) ou não expostos ao parasito (não infectados). A) População resistente parental não infectada e infectada. B) Indivíduos F1 não infectados e infectados. C) Indivíduos F2 não infectados e infectados.**



**Figura 6: Curvas de sobrevivência da população *B. tenagophila* de Joinville (S) e seus descendentes mantidos durante 10 semanas com exposição freqüente à miracídios de *S. mansoni* (infectados) ou não expostos ao parasito (não infectados). A) População suscetível parental não infectada e infectada. B) Indivíduos F1 não infectados e infectados. C) Indivíduos F2 não infectados e infectados.**

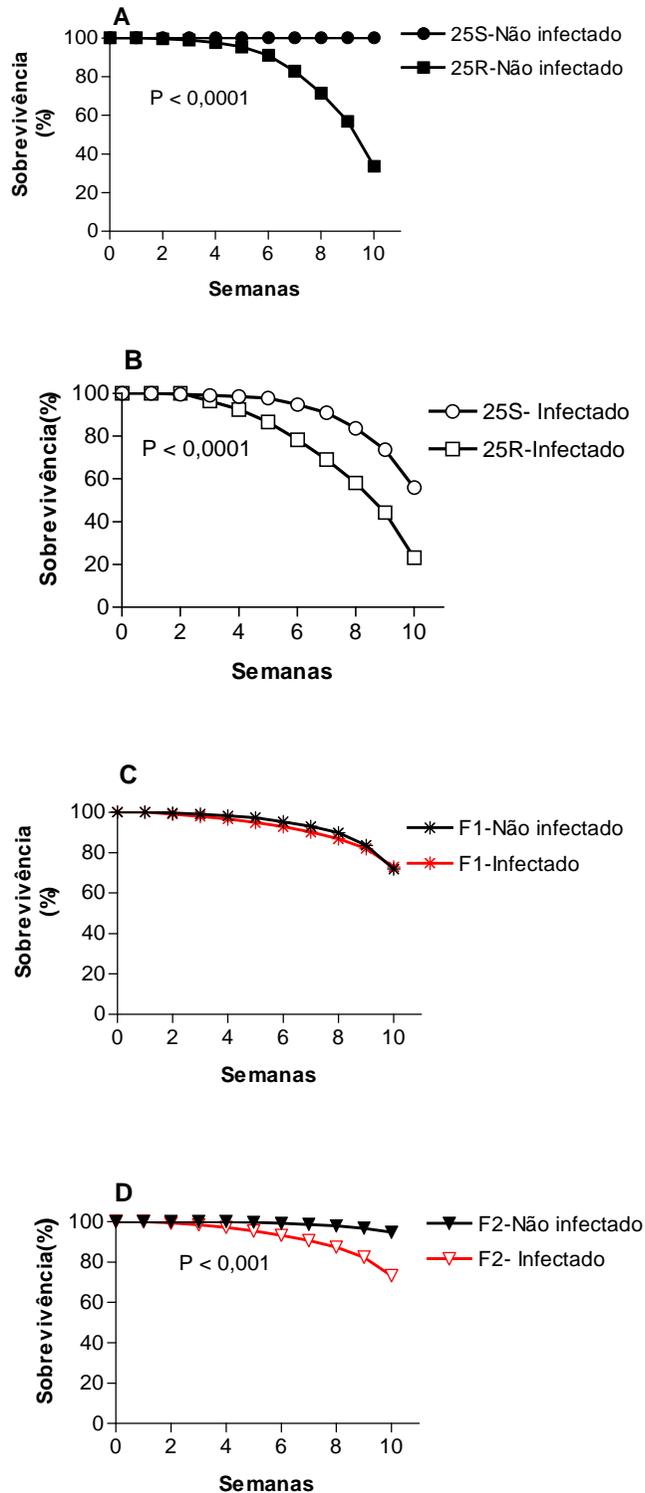
### **7.3- EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO *S. mansoni* NAS POPULAÇÕES MISTAS DE *B. tenagophila* DE LINHAGENS SUSCETÍVEIS E RESISTENTES.**

No intuito de verificar o comportamento de *B. tenagophila* do Taim quando mantido em associação com outra linhagem da mesma espécie, os índices de sobrevivência dos caramujos e seus descendentes foram examinados. A figura 7A mostra que no grupo constituído por 25 indivíduos resistentes e 25 suscetíveis, todos os caramujos suscetíveis da geração parental, quando não expostos ao parasito, permaneceram vivos durante o período de experimentação (10 semanas). Entretanto, somente 33 % dos indivíduos da população resistente mantida nesta associação conseguiram sobreviver. Ao comparar as curvas de sobrevivência dessas duas populações, associadas em proporção semelhante e sem a pressão do parasito, foram observadas diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0,0001$ ).

Conforme demonstrado na Figura 7B, o outro grupo também constituído por 25 caramujos resistentes e 25 suscetíveis, mas que foram expostos semanalmente ao parasito, apresentaram uma elevada mortalidade nas duas populações de caramujos estudadas.

A Figura 7C mostra que os descendentes F1 do grupo parental contendo 25R+25S apresentaram elevados índices de sobrevivência, mesmo quando submetidos à pressão do parasito, 72% não infectado e 76% infectado, não havendo diferenças estatisticamente significativas entre os indivíduos F1 normais e infectados.

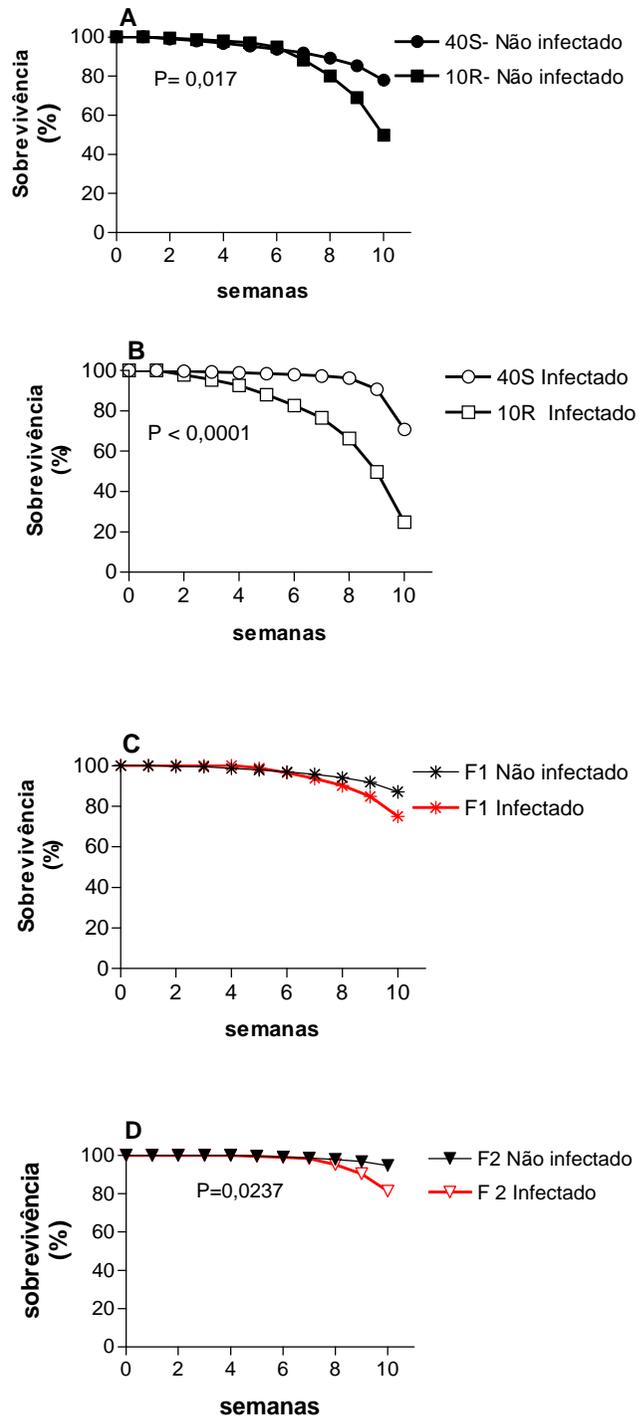
Os indivíduos da progênie F2 apresentaram diferenças significativas quando submetidas à pressão do parasito. Quando não infectados, 94% dos caramujos F2 permaneceram vivos durante o procedimento experimental, entretanto 73% dos indivíduos F2 foram capazes de sobreviver quando expostos ao *S. mansoni* ( $P < 0,001$ ).



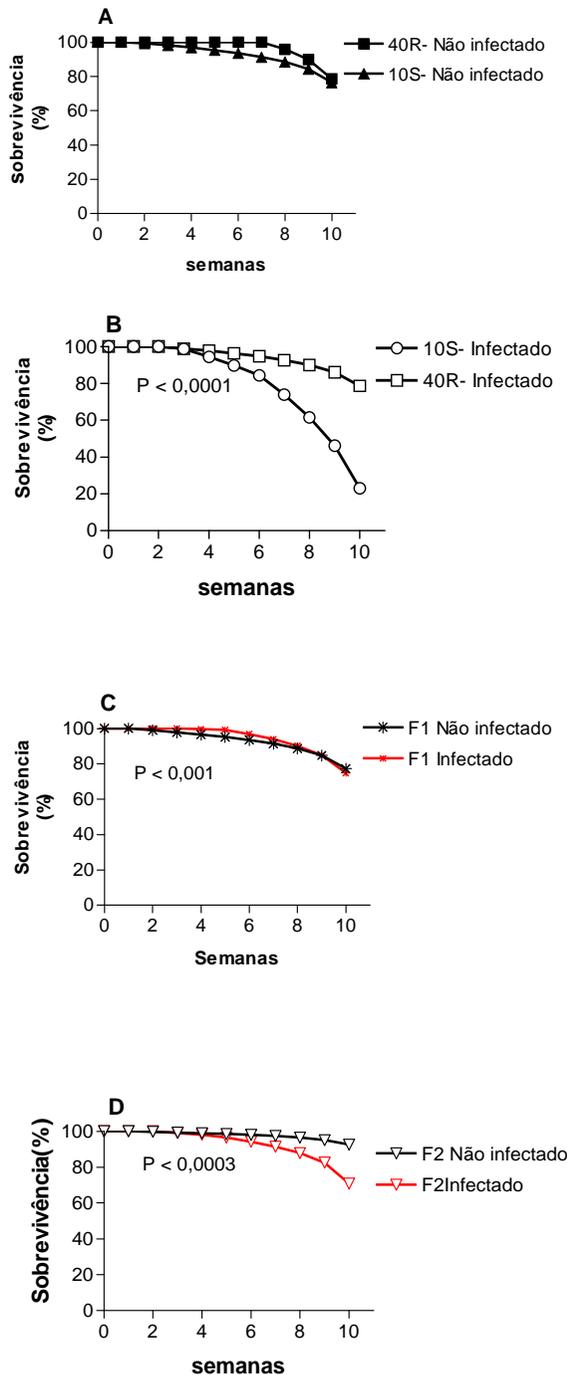
**Figura 7:** Curvas de sobrevivência dos 25 caramujos *B. tenagophila* de Joinville (S) e dos 25 *B. tenagophila* do Taim (R) e seus descendentes mantidos associados durante 10 semanas, com exposição freqüente à mirádios de *S. mansoni* (infestado) ou não expostos ao parasito (não infestados). **A)** Grupo (25R+25S) não infestado. **B)** Grupo (25R+25S) infestado. **C)** Indivíduos da progênie F1 obtidos do grupo (25R+25S), não expostos e expostos à pressão do parasito. **D)** Indivíduos da progênie F2 obtidas do grupo (25R+25S), expostos e não expostos à pressão do parasito.

Conforme apresentado na figura 8A, no grupo parental constituído por 40 indivíduos suscetíveis e 10 resistentes, 80% dos caramujos da população suscetível e 50% da população resistente, permaneceram vivos quando não infectados. ( $P=0,017$ ). Quando o grupo parental (40S+10R) foi submetido à pressão do parasito as taxas de sobrevivência da população suscetível foram reduzidas a 68% e a população resistente a 25% ( $P < 0,0001$ ) (Figura 8B). Ao analisar as curvas de sobrevivência da progênie F1 obtida deste grupo, observou-se que 87% dos caramujos F1 não infectados e 74% dos infectados estavam vivos durante o período de observação. (Figura 8C). De maneira semelhante os indivíduos F2 provenientes deste grupo apresentaram elevadas taxas de sobrevivência. Sendo que 94% dos caramujos F2 não infectados e 81% dos infectados conseguiram sobreviver durante o período de dez semanas (Figura 8D).

As curvas de sobrevivência do grupo parental constituído por uma maioria de indivíduos resistentes (40R+10S) indicam que durante o período de 10 semanas, 76% dos indivíduos resistentes não infectados ainda estavam vivos. Este valor foi estatisticamente semelhante ao detectado na população suscetível, cuja taxa de sobrevivência foi de 78% (Figura 9A). Entretanto, quando o grupo que continha esta mesma proporção de caramujos (40R + 10S) foi infectado, apenas 23% da população suscetível fomos capazes de sobreviver, enquanto 78% dos indivíduos resistentes continuaram vivos, diferença de sobrevivência que foi estatisticamente significativa ( $p < 0,0001$ ) (Figura 9B). A taxa de sobrevivência dos indivíduos da progênie F1 não infectados foi de 77% e dos infectados por *S. mansoni* foi de 74%, sendo que não houve diferenças estatisticamente significativa entre o grupo F1 infectado e não infectado (Figura 9C). Os descendentes F2 não expostos ao parasito apresentaram taxa de sobrevivência de 92% e os infectados 70,7%, estes valores quando comparados foram estatisticamente significativos ( $p=0,003$ ).



**Figura 8:** Curvas de sobrevivência dos 40 caramujos *B. tenagophila* de Joinville (S) e dos 10 indivíduos *B. tenagophila* do Taim (R) e seus descendentes mantidos associados durante 10 semanas, com exposição freqüente à miracidios de *S. mansoni* (infectado) ou não expostos ao parasito (não infectados). **A)** Grupo (10R+40S) normal. **B)** Grupo (10R+40S) infectado. **C)** Indivíduos da progênie F1 obtidas do grupo (10R+40S), não expostos e expostos à pressão do parasito. **D)** Indivíduos da progênie F2 obtidas do grupo (10R+40S), não expostos e expostos à pressão do parasito.



**Figura 9:** Curvas de sobrevivência dos 10 caramujos *B. tenagophila* de Joinville (S) e dos 40 indivíduos *B. tenagophila* do Taim (R) e seus descendentes mantidos associados durante 10 semanas, com exposição freqüente à miracidios de *S. mansoni* (infectados) ou não expostos ao parasito (não infectados). **A)** Grupo (40R+10S) não infectado. **B)** Grupo (40R+10S) infectado. **C)** indivíduos da progênie F1 obtidas do grupo (40R+10S) não expostos e expostos à pressão do parasito. **D)** Indivíduos da progênie F2 obtidas do grupo (40R+10S) não expostos e expostos à pressão do parasito

#### **7.4- EFEITO DA INFECÇÃO POR *S. mansoni* SOBRE OS PARÂMETROS DE FECUNDIDADE DOS CARAMUJOS DOS DIFERENTES GRUPOS EXPERIMENTAIS**

Inicialmente, foi verificado que a fecundidade dos grupos parentais não foi afetada pela pressão do *S. mansoni*, pois os valores referentes ao número de ovos/desova e ovos/caramujo dos grupos normais e infectados foram estatisticamente semelhantes na média das 10 semanas de experimentação. O mesmo foi observado com as progêneses F1 e F2 obtidas de cada grupo parental (Tabela 3). Entretanto, durante o experimento foi verificado que os grupos parentais 50S, 25S+25R e 40S+10R quando infectados apresentaram uma queda no número de ovos/caramujo durante a 5<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> semana, coincidindo com o maior período de eliminação de cercárias de *S. mansoni* (Tabela 4). Especificamente foi observado que o grupo constituído por 50 caramujos do Taim (resistentes) não expostos à infecção por *S. mansoni* produziu uma média de  $37 \pm 18$  ovos/caramujo durante o período (5-8 semanas) enquanto que os mesmos caramujos resistentes expostos à infecção produziram uma média de  $40 \pm 26$  ovos/caramujo neste mesmo período, não ocorrendo alteração na postura de ovos. Por outro lado, o grupo constituído por caramujos suscetíveis produziu uma média de  $23 \pm 15$ , ovos/caramujo durante o período de 5-8 semanas quando não expostos ao parasito e  $8 \pm 7$  ovos/caramujo quando infectados. Foi observado uma tendência na diminuição na produção de ovos entre 5<sup>o</sup> e 8<sup>o</sup> semana pós-infecção, em todos os grupos experimentais com predomínio da linhagem de caramujo suscetível, entretanto estes valores não foram estatisticamente significativos (Tabela 4).

**Tabela 3 - Média do número de ovos/desova e ovos por caramujo produzidos pelos grupos parentais e os descendentes F1 e F2 durante o período de 10 semanas, quando expostos ou não ao *S. mansoni*.**

Grupos	Média de ovos/desova	Média de ovos/caramujo
50R Normal	16 ±5	27±17
50R Infectado	20± 5	29±19
F1 Normal	16, ±4	33 ±11
F1 Infectado	21 ± 7	27±14
F2 Normal	13 ± 3	40±12
F2 Infectado	13 ± 2	30±10
50S Normal	11 ±4	17 ±12
50S Infectado	10 ± 3	12 ± 6
F1 Normal	13 ± 3	11 ±3
F1 Infectado	10 ± 4	19 ± 10
F2 Normal	12±3	25±7
F2 Infectado	11±2	20±8
25S+25R Normal	10± 2,	17±9
25S+25R Infectado	10 ± 3	17 ± 5
F1 Normal	13 ±3	21± 12
F1 Infectado	8 ±4	20 ± 12
F2 Normal	11±2	25±9
F2 Infectado	11±4	31±15
40S+10R Normal	13± 4	14±8
40S+10R Infectado	9±3	10 ± 8
F1 Normal	14 ± 3	32±13
F1 Infectado	11 ± 2	23 ± 12
F2 Normal	11±2	18±7
F2 Infectado	10 ±3	20±5
40R+10S Normal	13±3	23±6
40R +10S Infectado	11±2	24±15
F1 Normal	14 ±3	30 ± 22
F1 Infectado	11±2	24 ±9
F2 Normal	12±2	24±7
F2 Infectado	11± 2	22±4

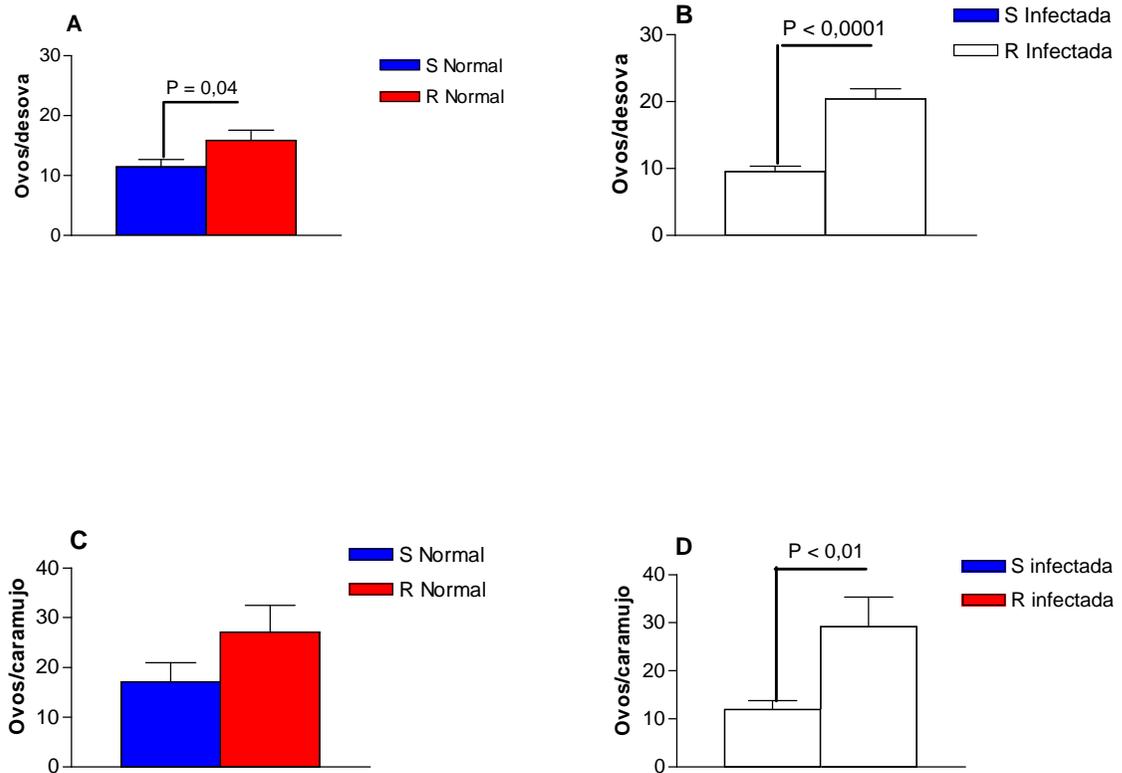
R= População resistente *B. tenagophila* do Taim  
S= População suscetível *B. tenagophila* de Joinville.

**Tabela 4 - Média do número de ovos por caramujo produzidos pelos grupos parentais durante o período (1-4) e de (5-8) semanas, quando expostos ou não ao *S. mansoni*.**

<b>GRUPOS</b>	<b>SEMANAS (1-4)</b>	<b>SEMANAS (5-8)</b>
50R Normal	29±10	37±18
50R Infectado	27±6	40±26
50S Normal	17±9	23±15
50S Infectado	19±10	9±7
25S+25R Normal	14,±7	22±12
25S+25R Infectado	22±10	13±11
40S+10R Normal	17±4	16,±9
40S+10R Infectado	14±10	8±7
40R+10S Normal	21±10	35±15
40R+10S Infectado	18± 4	27±6

Ao analisar o parâmetro de fecundidade produzido apenas pela população resistente e suscetível de *B. tenagophila* durante o período de dez semanas, foi observado que *B. tenagophila* do Taim mostrou-se mais fecunda do que a linhagem *B. tenagophila* de Joinville (Figura 10). A população resistente não infectada produziu em média  $16 \pm 5$  ovos/desova, enquanto suscetível normal  $11 \pm 4$  ovos/desova. A diferença entre estes dois grupos foi estatisticamente significativa ( $P=0,04$ ). Quando a população resistente foi infectada, a média do número de ovos/desovas foi de  $20 \pm 5$ , enquanto a população suscetível infectada apresentou uma média de  $10 \pm 3$  ovos/desova ( $P < 0,0001$ ).

A população resistente sem infecção produziu durante o período de 10 semanas em média  $27 \pm 17$  ovos/caramujo e a população suscetível normal produziu  $17 \pm 12$  ovos/caramujo, porém não houve diferenças estatisticamente significativas entre as duas populações. Quando infectada, a população resistente produziu uma média de  $29 \pm 19$  ovos/caramujo e a população suscetível infectada  $12 \pm 6$  ovos/caramujo. Neste caso as diferenças entre o número de ovos/caramujo produzidos pelas duas linhagens foram significativas ( $p < 0,01$ ).



**Figura 10: Parâmetros de fecundidade (ovos/desova e ovos/caramujo) produzidos durante o período de 10 semanas pelas populações resistente (R) e suscetível (S) de *B. tenagophila* quando mantidas isoladas submetidas ou não à pressão por *S. mansoni*. A) Representa média do número de ovos/desova produzidos pelas populações suscetível e resistente normal. B) Representa a média do número de ovos/desova produzidos pelas populações suscetível e resistente infectada C) Indica a média do número de ovos/caramujo produzidos pelas populações suscetível e resistente não infectada. D) Mostra a média do número de ovos/caramujo produzidos pelas populações suscetível e resistente quando infectada. A Comparação estatística do número de ovos/desova e ovos/caramujo produzidos pelas populações resistente e suscetível de *B. tenagophila* foi feita através do Teste t.**

Como parâmetro de fertilidade foi estimado a razão entre o número de ovos obtidos no início do experimento e o número de caramujos sobreviventes, após 30 dias da data de eclosão. Conforme demonstrado na tabela 5, *B. tenagophila* da linhagem do Taim além de produzir um número significativamente maior de ovos, também apresentou uma maior proporção de indivíduos sobreviventes. O rendimento final da eclosão do grupo parental formado pela população de *B. tenagophila* do Taim não infectada foi de 20,3% e do grupo infectado foi de 21,5%. O grupo formado pela população *B. tenagophila* de Joinville sem infecção apresentou um rendimento final de 13,48% e o grupo infectado 18,25%.

**Tabela 5- Rendimento final da eclosão após 30 dias, tomando como referência o número de ovos iniciais de cada grupo parental e o número de descendentes F1 sobreviventes.**

<b>Grupos</b>	<b>Número de ovos iniciais</b>	<b>Número de descendentes F1 sobreviventes</b>	<b>Rendimento final da eclosão (%)</b>
G1-50R	11.290	2.298	20,3
G2-50S	7.784	1.050	13,48
G3- 25R+25S	7.180	800	11,42
G4-40S+10R	5.394	540	10,01
G5-40R+10S	6.630	1.010	15,2
G6-50R	13.000	2.796	21,5
G7-50S	5050	922	18,25
G8- 25R+25S	5.850	630	10,76
G9-40S+10R	4.430	470	10,6
G10-40R+10S	5.230	932	17,82

## 7.5- TESTE DE SUSCETIBILIDADE DOS INDIVÍDUOS DA PROGÊNIE F1, F2 E F3

Amostras de indivíduos F1, F2 e F3 obtidos dos diferentes grupos experimentais foram submetidas à infecção pelo *S. mansoni*. Conforme demonstrado na tabela 6, os grupos parentais constituídos apenas por indivíduos *B. tenagophila* do Taim, tanto os mantidos sem exposição ao parasito (Grupo 1) como os expostos ao parasito (Grupo 6) apresentaram uma progênie F1 absolutamente resistente ao *S. mansoni*. Por outro lado, o grupo parental formado apenas por indivíduos suscetíveis sem infecção (Grupo 2) e infectados (Grupo 7) obteve uma progênie F1 com taxas de suscetibilidade de 62,5% e 50%, respectivamente. Os grupos parentais normais e infectados formados por uma mistura de caramujos resistentes e suscetíveis, independente da proporção inicial de *B. tenagophila* do Taim apresentaram uma F1 completamente resistente ao *S. mansoni*.

Os descendentes F2, procedentes dos grupos constituídos apenas por indivíduos resistentes normais (Grupo 1) e infectados (Grupo 6), continuaram resistentes ao *S. mansoni*. Enquanto os indivíduos das progênies F2 provenientes da população suscetível normal (Grupo 2) e infectada (Grupo 7) apresentaram taxas de infecção de 68,1 e 55%, respectivamente. De maneira interessante, a progênie F2 obtida dos grupos experimentais, formados por uma mistura de indivíduos resistentes e suscetíveis, apresentaram taxas de infecção inferiores a 5%, independente da proporção inicial de caramujos. Vale salientar que as maiores taxas de infecção da geração F2 (5% e 4,5 %) foram obtidas nos grupos experimentais com maior concentração inicial de caramujos suscetíveis (G3 e G4, respectivamente) (Tabela 6). Os testes de suscetibilidade realizados com os indivíduos da geração F3 revelaram que os caramujos procedentes da população Taim mantiveram-se resistentes ao parasito, enquanto os da população Joinville continuaram apresentar elevadas taxas de suscetibilidade. Os indivíduos

da progênie F3 apresentaram taxas de infecção de 0 a 4%. Os descendentes F3 procedentes do grupo parental formado por 40 caramujos suscetíveis e 10 resistentes foram os que apresentaram maiores taxas de infecção (4%). Após analisar o fenótipo suscetibilidade dos descendentes obtidos por meio de cruzamento entre populações parental resistente e suscetível de *B. tenagophila*, pode-se inferir que *B. tenagophila* do Taim foi capaz de transmitir os genes da resistência aos seus descendentes, visto que a maioria dos indivíduos analisados foram resistentes ao *S. mansoni*, (parte destes resultados foram publicados por Rosa et al. 2006).

**Tabela 6 - Suscetibilidade dos indivíduos das progênies F1, F2 e F3 obtidos de cruzamento entre *B. tenagophila* Taim X *B. tenagophila* Joinville, quando infectados individualmente com 30 miracidios da cepa LE de *S. mansoni*.**

Grupos parentais	% indivíduos F1 positivos	% indivíduos F2 positivos	% indivíduos F3 positivos
G1-50R	0	0	0
G2-50S	62,5	68,1	56
G3- 25R+25S	0	5,0	2,5
G4-40S+10R	0	4,5	4,0
G5-40R+10S	0	0	0
G6-50R	0	0	0
G7-50S	50	55	50
G8- 25R+25S	0	0	2,5
G9-40S+10R	0	2,4	0
G10-40R+10S	0	2,4	0

## 8- DISCUSSÃO

O primeiro aspecto analisado neste estudo foi a ocorrência do cruzamento entre a população resistente pigmentada *B. tenagophila* do Taim e a população suscetível albina *B. tenagophila* de Joinville. Em todos os grupos experimentais, a proporção de indivíduos F1 pigmentados foi maior do que os indivíduos F1 albinos. Inclusive o grupo constituído por uma maioria de indivíduos albinos (40S+10R) apresentou uma progênie F1 com 70% dos indivíduos pigmentados. Os resultados obtidos com os descendentes F1 foi o primeiro indício de que realmente ocorreu o inter cruzamento entre as duas populações. Entretanto, apenas os dados obtidos com a geração F1, apesar de altamente sugestivos, não são suficientes para confirmar o inter cruzamento das linhagens, pois parte dos indivíduos F1 pigmentados poderiam ter sido obtidos por meio do cruzamento apenas entre os indivíduos da população *B. tenagophila* do Taim. O surgimento de caramujos albinos na geração F2 comprova que realmente ocorreu o inter cruzamento entre *B. tenagophila* do Taim e *B. tenagophila* de Joinville, pois os indivíduos F1 que foram selecionados para obtenção dos descendentes F2 foram todos pigmentados. PARAENSE (1955) utilizou a linhagem albina de *B. glabrata* para demonstrar que a fecundação cruzada é a preferencial entre os moluscos do gênero *Biomphalaria*. Ensaio semelhante foram realizados com populações mistas de *B. glabrata* (LEWIS ET AL., 2003). Neste estudo os indivíduos suscetíveis albinos e resistentes pigmentados também foram mantidos juntos em diferentes proporções e grande parte dos indivíduos da progênie F1 eram pigmentados.

Neste experimento ficou demonstrado que o *S. mansoni* foi um fator de pressão seletiva negativa apenas para a população suscetível *B. tenagophila* Joinville. A população parental resistente, quando mantida isolada apresentou elevadas taxas de sobrevivência durante todo o

período observado, mesmo quando infectadas. Segundo COELHO (1954) a infecção pelo *S. mansoni* resulta em uma série de problemas no hospedeiro intermediário, como por exemplo, a mortalidade.

Nos grupos nos quais havia uma associação entre *B. tenagophila* do Taim e *B. tenagophila* Joinville, a sobrevivência da linhagem do Taim foi reduzida independentemente da exposição ao *S. mansoni*. Este comportamento sempre ocorreu quando o número de caramujos suscetíveis era igual ou superior ao da linhagem *B. tenagophila* do Taim. O resultado sugere que, quando em maior número, existe interferência negativa da linhagem suscetível sobre a linhagem resistente. De modo semelhante MICINCHELLLA & LO VERDE (1983) foram um dos poucos pesquisadores que observaram que determinados estoques de *B. glabrata* resistentes são afetados negativamente, pois ocorre uma redução no número desses indivíduos quando estão na presença de *B. glabrata* suscetível e também do parasito *S. mansoni*. Os fatores responsáveis pela mortalidade elevada da linhagem resistente nestas condições não foram investigados neste trabalho ou por MICINCHELLLA & LO VERDE (1983), entretanto é importante salientar que não está associado ao parasito. Apesar da elevada mortalidade observada na geração parental de *B. tenagophila* da linhagem do Taim mantida em desvantagem numérica com *B. tenagophila* da linhagem Joinville, é essencial ressaltar que os descendentes F1 e F2 destes grupos experimentais apresentaram elevadas taxas de sobrevivência. De maneira relevante, a elevada sobrevivência da progênie F1 e F2 foi mantida mesmo em grupos expostos ao *S. mansoni*. Este foi o primeiro indício de que, mesmo em desvantagem numérica, o caráter da resistência à infecção por *S. mansoni* é transmitido aos seus descendentes.

Segundo a literatura um dos efeitos do parasitismo por *S. mansoni* é o impacto da larva sobre o sistema reprodutivo do hospedeiro intermediário (LOOKER & ETGES, 1979; CREWS

& YOSHINO,1989). Embora muitos esporocistos se localizem na glândula digestiva do caramujo, alguns esporocistos podem invadir o ovoteste e ocasionar o bloqueio da postura dos ovos (PRATT & BARTON, 1941; ETGES & GRESSO, 1965; COOPER ET AL., 1996). Entretanto, para alguns pesquisadores a localização do parasito na gônada não é pré-requisito para que haja interrupção da postura, larvas situadas na glândula digestiva também podem de forma indireta afetar o processo reprodutivo do molusco (SLUITERS ET AL. 1980).

Foi observado que os grupos parentais formados por 50 caramujos suscetíveis, 25 resistentes e 25 suscetíveis, 40 suscetíveis e 10 resistentes apresentam uma redução no número de ovos/caramujo durante a 5<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> semana (período de maior eliminação de cercárias de *S. mansoni*), mesmo assim o teste estatístico utilizado (Teste t), não revelou diferenças significativas. Por outro lado, os grupos constituídos apenas por indivíduos resistentes e os formados por 40 caramujos resistentes e 10 suscetíveis não apresentaram qualquer tipo de redução no número de ovos/caramujo durante a 5<sup>o</sup> e 8<sup>o</sup> semana de infecção. Isto significa que a fecundidade da população resistente de *B. tenagophila* não foi afetada pelo *S. mansoni*. Os grupos F1, F2 normais e infectados não apresentaram diferenças quanto aos parâmetros de fecundidade (ovos/desova e ovos/caramujo), isto já era esperado visto que estes indivíduos provavelmente já possuem parte do material genético da linhagem resistente e não são tão prejudicados com o parasitismo.

Ao comparar os parâmetros de fecundidade da população resistente e suscetível foi verificado que a população *B. tenagophila* do Taim apresentou o melhor desempenho reprodutivo, ou seja, foi mais fecunda do que a linhagem suscetível *B. tenagophila* de Joinville. Os parâmetros de fertilidade tais como viabilidade dos ovos no sétimo dia, eclodibilidade não foram observados nesse tipo de estudo. O único aspecto que foi estimado foi a razão entre o número de ovos no início do experimento e o número de caramujos

sobreviventes, após 30 dias da data da eclosão. Vários pesquisadores demonstraram que apenas uma pequena proporção dos ovos se desenvolve em adultos e que o período de vida mais crítico do caramujo é justamente as primeiras semanas, onde ocorre as maiores taxas de mortalidade (STANDEN, 1951; BARLOW & MUENCH, 1951; PERLOWAGORA, 1958; FREITAS, 1973). Em nossos estudos o rendimento final também não foi muito expressivo, mas os grupos constituídos apenas pela linhagem resistente foram os que apresentaram o maior número de indivíduos F1 sobreviventes. O mesmo foi observado nos grupos constituídos por uma mistura de populações, onde havia uma maior proporção de caramujos resistentes.

Os testes de infecção com a cepa LE de *S. mansoni* realizados com os indivíduos das progênes F1, F2 e F3 demonstraram baixos índices suscetibilidade quando comparado com a linhagem parental suscetível. Isto significa que apesar das elevadas taxas de mortalidade a linhagem *B. tenagophila* do Taim foi capaz de transmitir o caráter resistência aos seus descendentes, pois grande parte dos indivíduos analisados estavam negativos para *S. mansoni*.. Estes resultados corroboram os dados obtidos por ROSA ET AL. (2005) que demonstram que o caráter resistência da linhagem *B. tenagophila* do Taim pode está sendo governado por dois genes dominantes. Um experimento semelhante foi realizado com populações resistente e suscetíveis de *B. glabrata*, porém apenas o fenótipo dos indivíduos da progênie F1 foram analisados e as populações parentais não foram submetidas à pressão do parasito (LEWIS ET AL. 2003). Neste estudo o número de indivíduos F1 resistentes também foi maior do que o número de indivíduos F1 suscetíveis.

Apesar das limitações, este tipo de estudo foi de suma importância, pois este experimento foi uma simulação do que poderia ocorrer no campo caso a linhagem *B. tenagophila* do Taim fosse introduzida.

**Parte 3- Introdução da linhagem resistente B. tenagophila do Taim em focos de transmissão de esquistossomose situados no município de Bananal.**

## 9- MATERIAL E MÉTODOS

### 9.1- ÁREA DE ESTUDO

O município de Bananal foi selecionado para testar o modelo de controle biológico mediante a introdução da linhagem *B. tenagophila* do Taim e está situado no extremo leste do estado de São Paulo (latitude 22 ° 40'44 "S e longitude 44 ° 19'08 "W) a uma altitude de 560 m. As divisas de Bananal do lado Fluminense são com Barra Mansa a norte, com Rio Claro a leste e com Angra dos Reis ao Sul. Do lado Paulista, a oeste, ficam São José do Barreiro e Arapeí. Os acessos são pela Rodovia Presidente Dutra (BR-116), Rodovia dos Tropeiros (SP-068), Rodovia Resgate (SP-064) e Estrada da Bocaina (SP-247) (Figura 11).

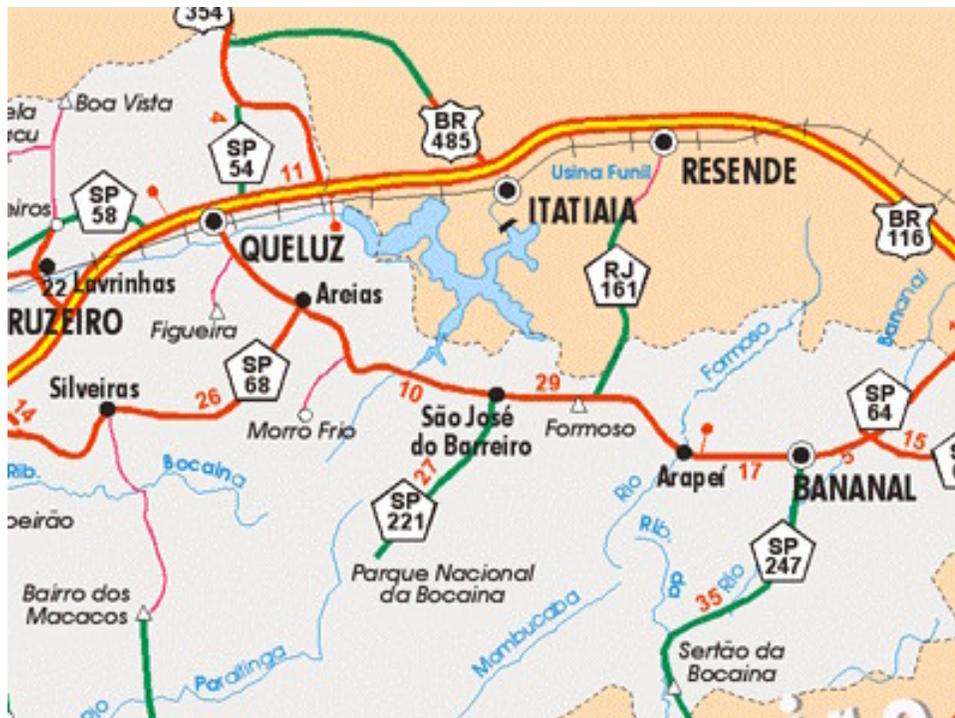
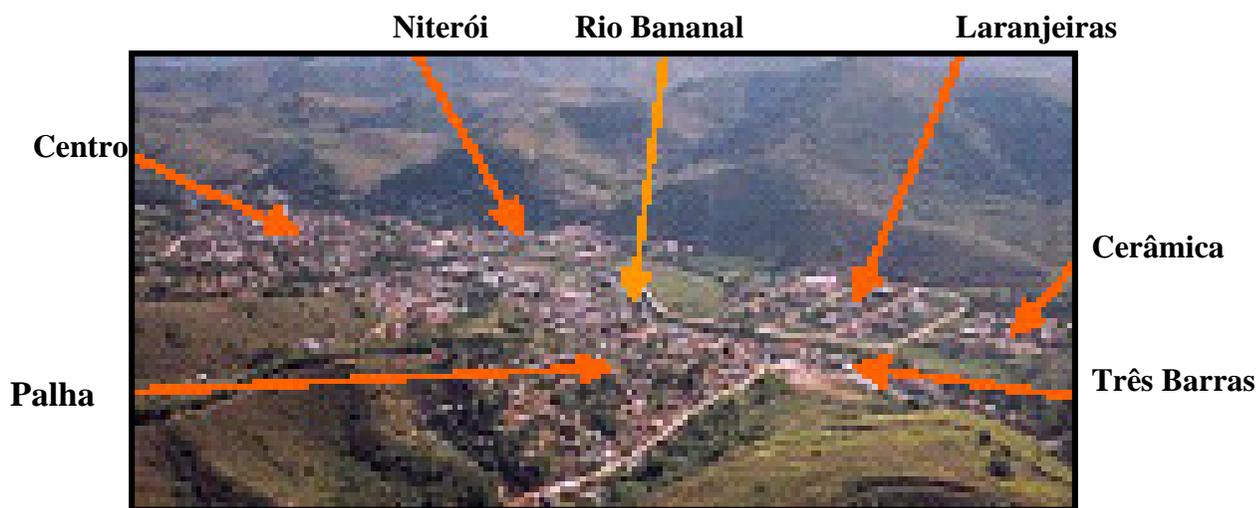


Figura 11- Acessos rodoviários de Bananal, São Paulo, Brasil.

O município possui 618,7 Km<sup>2</sup> e a ocupação humana de aproximadamente 16 habitantes/Km<sup>2</sup>. O núcleo urbano compõe-se na margem direita do Rio Bananal que corta a cidade, do Centro e dos bairros Vila Bom Jardim e Palha, e na margem esquerda, dos bairros de Niterói, Laranjeiras, Cerâmica e Três Barras. (Figura 12). Os maiores adensamentos residenciais e populacionais do município estão no Centro e Vila Bom Jardim (TELES, 2006). A configuração da rede hidrográfica de Bananal é bem extensa sendo constituída pelo rio Bananal, afluente do rio Paraíba do Sul e que possui os seguintes tributários: Paca Grande, Braço, Turvo, Pirapitinga, Manso, Vermelho, Carioca, Prata, Pilões, Lava-Pés e Bocaina



**Figura 12: Panorama da área urbana de Bananal, São Paulo**  
**Fonte: TELES, 2006.**

## 9.2- LEVANTAMENTO MALACOLÓGICO

Os focos de transmissão do *S. mansoni* no município de Bananal foram identificados e delimitados por TELES ET AL. (2002), após um intenso levantamento malacológico que ocorreu durante o período de 1998 –2001. Em Fevereiro de 2005, tomando como referência as áreas de transmissão estabelecidas por estes pesquisadores, foi realizado uma nova coleta nos córregos Antônio Siqueira, Lava Pés e da Chácara Santa Inês. Para coletar os moluscos foi utilizada uma concha de captura composta de uma armação de metal dotada de tela com malha de 2 mm e área aproximada de 300 cm<sup>2</sup>, fixada em um cabo de madeira (“Pá de Miguel”). A técnica de coleta consistiu em raspar, com a concha de captura, a vegetação submersa, as margens e o fundo dos criadouros buscando-se a captura do maior número possível de caramujos. Este procedimento foi realizado por duas pessoas, entretanto o número de conchadas e tempo da coleta não foram registrados (Figura 13).

Os exemplares coletados foram acondicionados em cubas de plástico e remetidos ao Laboratório de Esquistossomose do Departamento de Parasitologia, ICB/UFMG. No laboratório todos os caramujos foram individualmente acondicionados em frascos de vidro e expostos à luz artificial por aproximadamente 4 h, procedimento que estimula a eliminação natural de cercárias (PELLEGRINO & MACEDO, 1955). Depois de quatro semanas, os caramujos que se apresentaram negativos, no primeiro exame, foram expostos novamente à luz. As cercárias eliminadas com formas diferentes das de *S. mansoni*, foram fixadas em formol 10 % e posteriormente foram identificadas com base em caracteres morfológicos. A identificação morfológica dos moluscos foi realizada segundo a técnica descrita por PARAENSE & DESLANDES (1955). Nesta fase, alguns exemplares de *B. tenagophila*,

coletados antes da intervenção, foram mantidos no laboratório para obtenção de desovas visando testes de suscetibilidade.



**Figura 13: Levantamento malacológico das áreas de transmissão do município de Bananal- SP.**

### **9.3- CRIAÇÃO DE *B. tenagophila* DO TAIM EM LARGA ESCALA**

#### **9.3.1- LOCAL E MONTAGEM DOS TANQUES**

Com o objetivo de introduzir *B. tenagophila* Taim em áreas endêmicas onde *B. tenagophila* é a principal espécie transmissora, estabeleceu-se uma criação em larga escala na Chácara Santa Inês - Vila Bom Jardim – Bananal - São Paulo. Para esta finalidade foi utilizado um galpão que dispõe de quatro grandes tanques de alvenaria com dimensões de 6,30m de comprimento por 0,50m de profundidade e 0,50m de largura e capacidade de 320L, que serviram de ambiente de crescimento para os moluscos. O quinto tanque, com dimensão menor e com capacidade para 160L foi utilizado para eclosão das desovas e criação de recém nascidos (berçário). O fundo de cada tanque foi recoberto por uma camada de terra vermelha com 10% de carbonato de cálcio. Todos os tanques contêm um escoadouro que consiste de um cano de PVC com 20 cm de altura e com topo telado a fim de facilitar a limpeza sem perda de exemplares. Para evitar que fêmeas de culicídeos realizassem a postura de ovos, todos os tanques foram tampados com uma tela fina de Nylon com um sistema móvel com ripas de madeira, para facilitar o manejo (Figura 14).

A iluminação da área é natural e a água que abastece os tanques vem diretamente de uma nascente local. O pH da água é de aproximadamente 7,0 e esta circula pelos tanques diariamente. As torneiras que abastecem os tanques são teladas para evitar possíveis contaminantes que possam vir com a água. Para a conservação de calor e manutenção da temperatura da água entre 20 e 23°C, principalmente no inverno, parte do galpão foi isolada com lona plástica preta, propiciando um efeito estufa e conseqüentemente estabilizando as temperaturas (Figura 15).



**Figura 14:** Tanques de criação de *B. tenagophila* do Taim.



**Figura 15:** Sistema de aquecimento utilizado no inverno.

### 9.3.2- CRIAÇÃO E ALIMENTAÇÃO

A colônia de *B. tenagophila* do Taim iniciou-se com 1200 exemplares, de 9 a 12 mm de diâmetro, procedentes do moluscário do Laboratório de Esquistossomose do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG. Os exemplares iniciais da colônia foram distribuídos nos quatro tanques e placas de isopor de 15 cm foram colocadas na superfície da água para o depósito das desovas. Quando repletas de desovas, as placas foram transferidas para o tanque utilizado como “berçário”, os caramujos recém-eclodidos permaneciam neste local até atingirem diâmetros de 3 a 4 mm.

A dieta dos caramujos foi semelhante à utilizada no moluscário do laboratório de esquistossomose ICB\_UFMG e consiste em folhas de alface fresca e ração. A ração de caramujo foi padronizada por FREITAS (1973) e é composta por 1 kg de alfafa, 1 kg de ração de camundongo, 500 g de germe de trigo, 300 g de carbonato de cálcio, 50 g de vitormônio (ração para peixe), 300 mg de Ephinal (vitamina E), 100 g de leite em pó. Foi padronizado que cada tanque contendo em média 2000 exemplares receberia diariamente 50 g de ração, enquanto o berçário 25 g.. No berçário a ração foi distribuída pelo tanque uma semana antes da eclosão, para a formação de uma camada de algas e fungos. Segundo FREITAS (1973) esta é a principal fonte nutricional para os caramujos recém-eclodidos. Para fortalecer as conchas dos caramujos foram adicionados 20 g de carbonato de cálcio, a cada 15 dias em cada tanque.

#### 9.4- INTRODUÇÃO NO CAMPO

Para o reconhecimento dos exemplares de *B. tenagophila* do Taim introduzidos no campo, foi desenvolvido um método de marcação física. Estudos preliminares demonstraram que o tipo de marcação que será descrito a seguir não foi prejudicial ao caramujo. Os exemplares resistentes de *B. tenagophila* do Taim com 9 a 12 mm de diâmetro, receberam um furo de cerca de 1 mm, localizado lateralmente na proximidade da abertura superior da concha para perpassar de um fio de nylon, que depois de um nó, forma um pequeno anel (Figura 16). Assim marcados, os caramujos foram acondicionados em cubas de plástico que continham cinco camadas de papel toalha umedecido, sendo que em cada camada foram acomodados 100 caramujos. Depois, os caramujos foram introduzidos nos pontos previamente determinados, geralmente na cabeceira dos córregos. A avaliação da capacidade de dispersão e estimativa da população local aconteceu duas semanas após as introduções. Para esta avaliação, os moluscos foram coletados nas proximidades dos ambientes hídricos onde ocorreram as introduções e os exemplares marcados e não marcados foram contados. A proporção de caramujos marcados em relação aos não marcados permite, por regra de três simples, determinar, com boa precisão o número total de caramujos do habitat considerado (COELHO ET AL., 1986). A fórmula utilizada neste estudo foi:

$$\text{Densidade populacional} = \frac{AXC}{B}$$

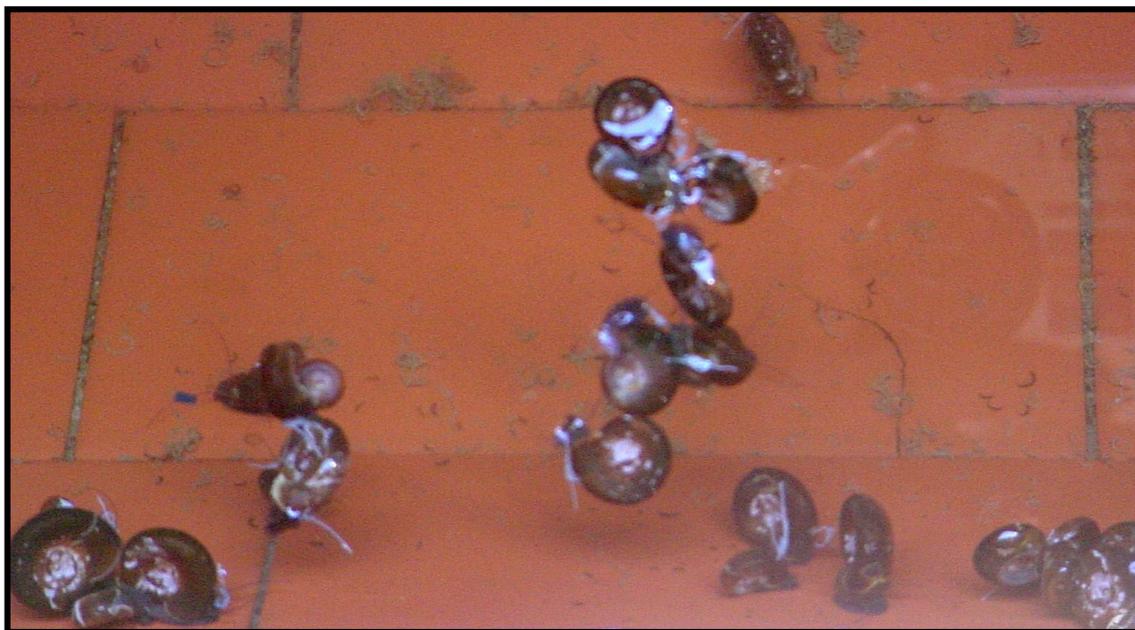
A= Total de caramujos capturados, marcados e não marcados.

B= Total de caramujos recapturados, marcados.

C= Total de caramujos marcados introduzidos no habitat logo após a marcação.

## 9.5- MONITORAMENTO DAS ÁREAS SOB INTERVENÇÃO

Para verificar se o patrimônio genético de *B. tenagophila* da linhagem Taim estava sendo transmitido à população local, capturas foram realizadas com periodicidade trimestral. Os caramujos resistentes geralmente eram introduzidos nas cabeceiras dos Córregos e o monitoramento foi realizado ao longo de todo o seu trajeto. A coleta foi realizada por duas pessoas e foram dadas várias conchadas, o objetivo era capturar o maior número de moluscos. Os exemplares jovens coletados foram acondicionados em cubas de plástico e remetidos ao Laboratório de Esquistossomose do Departamento de Parasitologia - ICB/UFMG para exame parasitológico, teste molecular e teste de suscetibilidade.



**Figura 16: Exemplares de *B. tenagophila* do Taim com suas conchas marcadas com o fio de nylon.**

### **9.5.1- Exame parasitológico**

Para a identificação de cercárias de *S.mansoni* e de outros trematódeos, todos os caramujos foram expostos individualmente à luz artificial de acordo com o protocolo descrito por PELLEGRINO & MACEDO(1955), já detalhado na seção anterior.

### **9.5.2- Teste molecular**

Parte dos caramujos jovens coletados no campo foi submetida à técnica PCR-RFLP para detecção do marcador molecular de caráter dominante típico da linhagem do Taim (350pb), conforme detalhado no capítulo 1. Resumidamente, uma porção da região cefalopodal de cada caramujo foi submetida a extração de DNA, para esta finalidade foi utilizado o KIT de purificação de DNA Wizard Genomic (Promega). O DNA extraído de cada caramujo foi submetido à técnica de PCR conforme descrito por VIDIGAL ET AL. (2000), os iniciadores utilizados foram ETTS1 e ETTS2. O produto de amplificação, constituído de um fragmento de aproximadamente 1.300pb, foi submetido à restrição com a enzima *Ddel* por 3:30 h à 37<sup>o</sup> C. Posteriormente, a enzima foi extraída de cada tubo com fenol/clorofórmio (1:1) e 3 uI dos produtos foram visualizados em gel de poliarilamida (6%) corado pela prata. O perfil espécie-específico esperado para *B. tenagophila* é de dois fragmentos (800, 470 pb) e para a população do Taim, além destes dois fragmentos, é esperado um terceiro fragmento de 350pb.

### 9.53- Teste de suscetibilidade

Caramujos, coletados antes e após as intervenções, foram mantidos no laboratório para coleta de desovas visando testes de suscetibilidade. Os descendentes F1 provenientes desses moluscos foram submetidos inicialmente aos testes de infecção com 20 miracídios da cepa LE de *S. mansoni*. Entretanto, os resultados indicaram que esta cepa não foi compatível com os caramujos de Bananal. A outra cepa de *S. mansoni* selecionada para este estudo foi a SJ que foi isolada de caramujos naturalmente infectados da região de São José dos Campos, estado de São Paulo e foi gentilmente cedida pela Urara Kawazoe. Esta cepa vem sendo mantida há mais de 25 anos em laboratório em infecções sucessivas em hamsters e em *B. tenagophila* e com passagens esporádicas em *B. glabrata*. Cada caramujo com aproximadamente 7 mm de diâmetro foi infectado com 20 miracídios da cepa SJ de *S. mansoni* segundo a técnica descrita por PELLEGRINO & KATZ (1968). A taxa de infecção foi confirmada através da eliminação de cercárias do parasito em caramujos expostos a luz artificial entre 30-50 dias após a exposição ao miracídio. A taxa de suscetibilidade à cepa SJ de *S. mansoni* foi experimentalmente avaliada em caramujos coletados antes e após as introduções.

## 10- RESULTADOS

### 10.1- LEVANTAMENTO MALACOLÓGICO

Baseando-se nos focos de transmissão descritos por TELES ET AL. (2002), em Fevereiro de 2005, foi realizado uma pesquisa malacológica nas seguintes áreas: Córrego Antônio Siqueira, Lava-Pés e Córrego da Chácara Santa Inês. Foram coletados 251 exemplares de moluscos, todos identificados como *B. tenagophila* e nenhum exemplar estava eliminando cercárias de *S. mansoni* (Tabela 7). As Xifidiocercárias estavam presentes em 4% dos caramujos examinados.

**Tabela 7 – Taxa de infecção natural de *S. mansoni* dos moluscos coletados em coleções hídricas do Município de Bananal em Fevereiro de 2005 (antes das introduções).**

Localidades	Espécie	Número de caramujos coletados	%positividade para <i>S. mansoni</i>
Córrego Antônio Siqueira	<i>B. tenagophila</i>	55	0
Córrego Lava-pés	<i>B. tenagophila</i>	154	0
Córrego da Chácara Santa Inês	<i>B. tenagophila</i>	42	0

Por meio da pesquisa malacológica realizada no município de Bananal foi possível confirmar a presença de *B. tenagophila* e definir as áreas de introdução da linhagem *B. tenagophila* do Taim. Os pontos escolhidos foram: Córrego Lava Pés, Córrego da Chácara Santa Inês, Córrego do Sítio São José do Retiro (Figura 17).



**Figura 17: Croqui da área urbana de Bananal com detalhes da drenagem natural . As setas indicam os locais onde foram feitas as introduções.**

## **10.2- CRIAÇÃO EM LARGA ESCALA DA LINHAGEM *B tenagophila* do Taim.**

O período inicial da criação foi considerado como o mais crítico. Dos 1200 caramujos que estavam distribuídos nos tanques, apenas 232 indivíduos sobreviveram. A taxa de mortalidade da *B. tenagophila* do Taim no primeiro mês chegou a 80,6%. Entretanto, os sobreviventes propiciaram o repovoamento rápido dos tanques, estabelecendo uma densidade populacional superior à inicial. A partir do quarto mês já se observavam exemplares superiores a 5 mm de diâmetro. Com o tempo, a criação se estabilizou e as taxas de mortalidade dos caramujos jovens e adultos não ultrapassaram a 20%.

Para o sucesso da criação, a adequação do fornecimento de alimentos garantiu a reprodução e crescimento da colônia. Inicialmente, cada tanque recebia 25.0 gramas de ração a cada dois dias. Depois de três meses, a população aumentou consideravelmente o que exigiu a

duplicação da quantidade de alimento e o fornecimento diário. A partir daí, ocorreu a recuperação do ritmo de crescimento. Outros aspectos tais como qualidade da água, controle da temperatura, disponibilidade de espaço foram de grande relevância para a produção em larga escala da linhagem *B. tenagophila* do Taim.

### **10.3- INTRODUÇÃO DA LINHAGEM RESISTENTE**

Durante o período de 2005-2006, foram realizados estudos preliminares nos locais escolhidos para a introdução da linhagem *B. tenagophila* do Taim. Os resultados obtidos não foram satisfatórios e demonstraram a importância de se estimar a densidade populacional de *B. tenagophila* local durante as introduções. Portanto, ficou estabelecido que todos os exemplares resistentes com 9-12 mm de diâmetro introduzidos teriam suas conchas marcadas e após 15 dias seriam recapturados.

Em Agosto de 2007, período no qual foi detectado uma redução na população local de caramujos, 1.000 exemplares de *B. tenagophila* do Taim marcados foram distribuídos nas seguintes localidades: Córrego da Chácara Santa Inês, Córrego Lava Pés e Córrego São José do Retiro. Os caramujos introduzidos foram recapturados após quinze dias, para avaliação da densidade populacional (Tabela 8). No Córrego da Chácara Santa Inês foram distribuídos 300 exemplares de *B. tenagophila* do Taim. Após 15 dias da introdução inicial, 54 caramujos foram capturados neste local, sendo que 38 encontravam-se fisicamente marcados (linhagem do Taim) e 16 não marcados (linhagem local). A população total foi estimada em 426 indivíduos sendo que 70% eram *B. tenagophila* do Taim e 30% eram caramujos locais. No córrego Lava Pés foram introduzidos 400 caramujos *B. tenagophila* do Taim. Após 15 dias,

foi observado que dos 61 caramujos coletados, 41 exemplares eram *B. tenagophila* do Taim e 20 exemplares eram caramujos locais. A densidade populacional deste local foi estimada em 596 indivíduos, sendo que 67% eram *B. tenagophila* da linhagem Taim. Os 300 exemplares de *B. tenagophila* da linhagem Taim restantes foram introduzidos no Córrego São José do Retiro. Os resultados referentes à captura de moluscos mostraram que dos 259 caramujos coletados, 10 caramujos estavam fisicamente marcados (linhagem do Taim) e 249 caramujos apresentaram-se não marcados (linhagem local). A densidade populacional foi estimada em 7.770 indivíduos e apenas 4 % dos exemplares desta população eram *B. tenagophila* do Taim

**Tabela 8– Avaliação da densidade populacional de *B. tenagophila* Taim em habitats onde ocorreram a introdução, Agosto de 2007**

Localidade	Número de Taim marcados introduzidos	Total de caramujos capturados ( $\geq 5$ mm).	Número de caramujos marcados capturados	Número de caramujos locais capturados	População total estimada	% da população do Taim
Chácara St. Inês	300	54	38	16	426	70
Lava Pés	400	61	41	20	596	67
São José do Retiro	300	259	10	249	7.770	4

## **10.4- MONITORAMENTO DAS ÁREAS DE INTRODUÇÃO**

### **10.4.1- Exame dos caramujos**

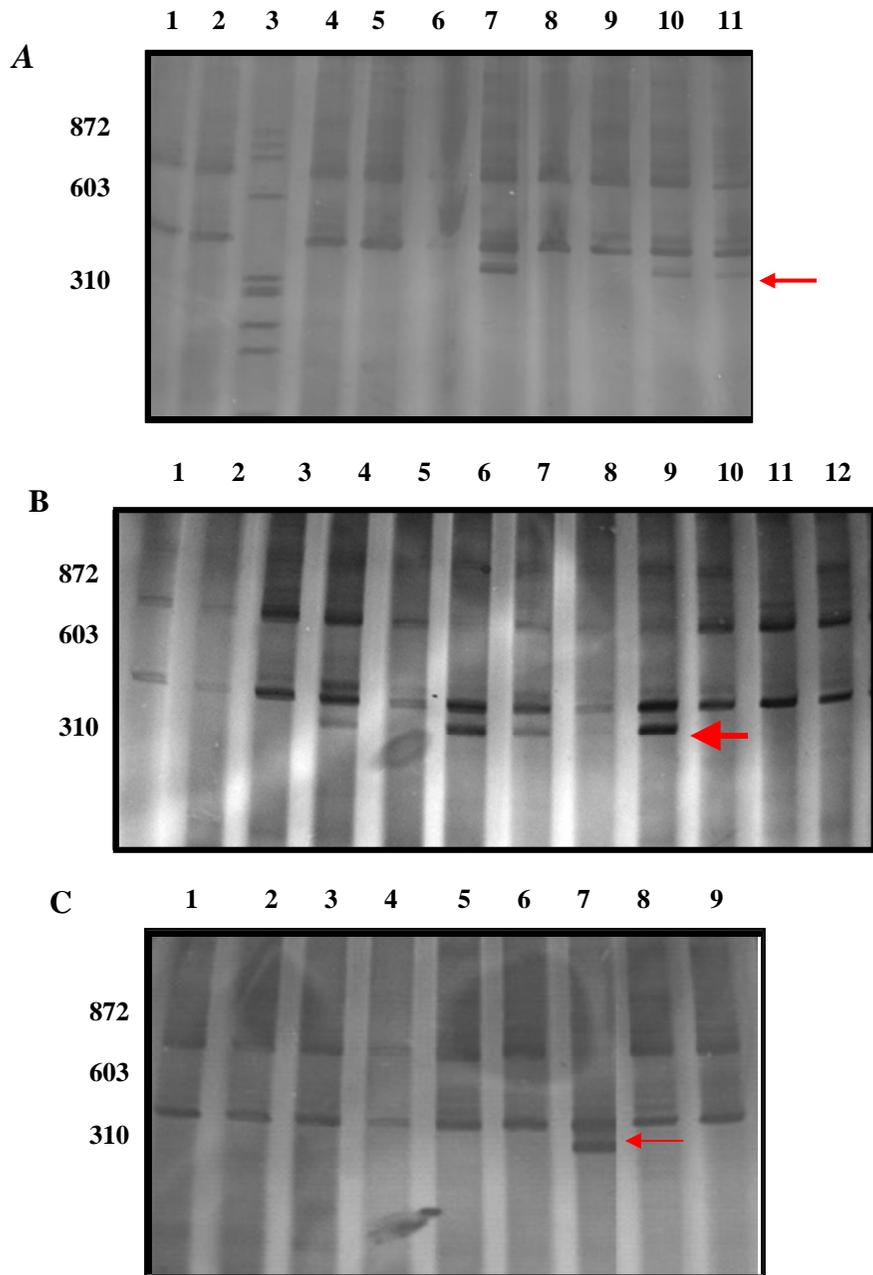
Após três meses da introdução, foi iniciado o monitoramento das áreas onde a densidade populacional de *B. tenagophila* do Taim foi introduzida e inicialmente estimada. No córrego da chácara Santa Inês foram coletados 49 exemplares de *B. tenagophila* e nenhum estava positivo para *S. mansoni*. Os 400 exemplares de *B. tenagophila* coletados no córrego Lava Pés, também não estavam infectados com *S. mansoni*. No Córrego do Sítio São José do Retiro foram capturados 365 espécimes de *B. tenagophila* e todos negativos para *S. mansoni*.

### **10.4.2- Testes moleculares**

Trinta e cinco exemplares de *B. tenagophila* com diâmetros inferiores a 5 mm, coletados no córrego da Chácara Santa Inês, foram submetidos à técnica PCR-RFLP. Dos 25 caramujos que tiveram o seu DNA amplificado, nove (36%) apresentaram a banda de 350 pb (típico da população do Taim). A Figura 18A mostra que as amostras de DNA aplicadas nas canaletas 7, 10 e 11 apresentam o perfil típico de *B. tenagophila* da linhagem do Taim, sugerindo o estabelecimento da população resistente no local.

Os testes moleculares realizados em 53 caramujos coletados no Córrego Lava Pés demonstraram que 43% dos indivíduos apresentaram o marcador molecular da linhagem resistente introduzida. A Figura 18B, mostra o perfil molecular de alguns exemplares de *B. tenagophila*, sendo que as canaletas 4, 6, 7, 8 e 9 indicam o perfil molecular da linhagem *B. tenagopila* do Taim, ou seja presença do marcador molecular de 350pb.

Quarenta espécimes de *B. tenagophila* coletados no Córrego São José do Retiro foram submetidos à técnica PCR\_RFLP e apenas um indivíduo apresentou o marcador molecular de 350 pb (3%) (Figura 18C).



**Figura 18-** Perfis de restrição do fragmento de 1300pb de *B. tenagophila*, após a digestão com a enzima *DdeI*, em gel de poliacrilamida 6% corado pela prata **A)** canaletas de 1-11 indicam o perfil de restrição de alguns filhotes de *B. tenagophila* coletados após a intervenção no Córrego da Chácara Santa Inês. Sendo que a canaleta 3 representa o perfil do padrão de peso molecular. As amostras de DNA das canaletas 7,10,11 apresentam os três fragmentos (800,400 e 350 pb). O fragmento de 350 pares de base de caráter dominante é típico da linhagem do Taim está indicado pela seta. **B)** canaletas de 1-12 indicam o perfil de restrição de alguns filhotes de *B. tenagophila* coletados no Córrego Lava Pés, após as introduções. As amostras de DNA das canaletas 6, 9,10, 12 13 apresentam o fragmento de 350 pb. **C)** canaletas de 1-9 indicam o perfil de restrição de alguns filhotes de *B. tenagophila* coletados no Córrego São José do Retiro, após as introduções. Sendo que a amostra de DNA presente na canaleta 7 possui o fragmento de 350pb. Os valores à esquerda do gel correspondem aos valores do peso molecular.

#### 10.4.3- Teste de suscetibilidade

Os descendentes F1 provenientes dos caramujos locais, coletados antes e após as intervenções, foram submetidos ao teste de infecção com a cepa SJ de *S. mansoni*. A cepa disponível no laboratório para as infecções experimentais, denominada de cepa SJ, não foi capaz de produzir altas taxas de infecção nos caramujos do município de Bananal. Os resultados encontram-se sintetizados na tabela 9.

A taxa de suscetibilidade à cepa SJ de *S. mansoni* dos caramujos coletados no Córrego da Chácara Santa Inês, antes das introduções, foi de 2%. Não foi possível detectar a suscetibilidade dos caramujos coletados do Córrego da Chácara Santa Inês, após as introduções. Foram coletados apenas 49 exemplares de *B. tenagophila*, e os 35 caramujos que conseguiram sobreviver foram submetidos aos testes moleculares.

Os caramujos da espécie *B. tenagophila* coletados no Córrego Lava Pés apresentavam, antes das introduções, taxas de suscetibilidade à infecção experimental com a cepa SJ de *S. mansoni* de 2%. Na coleta realizada aos 3 meses após a introdução da linhagem resistente, a suscetibilidade dos caramujos à infecção experimental por *S. mansoni* foi de 1,5%.

Os caramujos do Córrego São José do Retiro, local onde a linhagem resistente introduzida representou menos que 4% da população total, apresentaram taxas de infecção de 3% antes e após as infecções.

**Tabela 9- Taxa de suscetibilidade à cepa SJ de *S. mansoni* dos moluscos coletados no município de Bananal antes e após as intervenções. Caramujos foram examinados durante o período de 30-90 dias de infecção.**

	Localidade	Número de caramujos infectados	Número de caramujos sobreviventes	Número de caramujos eliminando cercárias	% de caramujos sobreviventes eliminando cercárias
<i>B. tenagophila</i> de Bananal antes das intervenções	Santa inês	50	50	01	2%
	Lava Pés	50	45	01	2%
	São José do Retiro	70	67	02	3%
<i>B. tenagophila</i> de Bananal após as intervenções	Santa inês	N	N	N	N
	Lava Pés	70	65	01	1,5%
	São José do Retiro	70	70	02	3%

N= Teste de suscetibilidade não foi realizado.

## 11- DISCUSSÃO

O modelo experimental de transferência da resistência ao desenvolvimento de *S. mansoni* de *B. tenagophila* da linhagem Taim para linhagens suscetíveis foi testado no município de Bananal, no estado de São Paulo. Este município foi escolhido pelo fato da área apresentar estudos anteriores bem documentados da transmissão de esquistossomose nos quais ficam evidente que *B. tenagophila* é a única espécie de molusco responsável pela transmissão da doença (TELES, 2001, TELES ET AL., 2002). As medidas de controle adotadas, como tratamento das pessoas infectadas pelo *S. mansoni*, uso de moluscicida, atendimento total das residências da área urbana do município pela rede de saneamento básico, resultaram em redução da prevalência da esquistossomose para níveis inferiores a 1%. Entretanto, persistem no local alguns portadores humanos do parasito que mantém a possibilidade da reativação eventual dos focos de transmissão, devido à presença dos moluscos suscetíveis.

Tomando-se como referência os resultados obtidos por TELES ET AL. (2002) foi realizada uma nova coleta malacológica nas áreas de transmissão para definir as áreas mais propícias para a introdução da linhagem resistente. Todos os exemplares coletados foram identificados como *B. tenagophila* e nenhum dos moluscos apresentava-se positivo para *S. mansoni*. Esse resultado corrobora as constatações de diversos autores sobre o fato de *B. tenagophila* ser a principal espécie transmissora no município de Bananal (CORRÊA ET AL., 1962; PIZA ET AL., 1972; PIZA ET AL., 1975; TELES ET AL., 2002). A ausência de caramujos infectados com *S. mansoni* durante o levantamento malacológico, realizado antes das introduções, pode ser uma consequência da intensa campanha de controle realizada pela SUCEN no município durante o período de 1998 a 2002.

Antes das introduções de exemplares da linhagem resistente nas áreas escolhidas, foi essencial a padronização dos procedimentos destinados à criação em larga escala de *B. tenagophila* do Taim. Este foi um dos grandes desafios do presente estudo, pois foram realizadas várias adaptações. A técnica descrita por FREITAS (1973) foi de grande importância para estabelecer a criação.

As primeiras introduções não tiveram êxito, pois todos os exemplares examinados após quatro meses apresentaram o perfil molecular apenas da linhagem local de *B. tenagophila*. A explicação mais plausível foi que o número de caramujos introduzidos *B. tenagophila* do Taim não foram suficientes para exercer a pressão necessária para que o cruzamento com a linhagem local ocorresse de maneira significativa. Partindo deste pressuposto, foi estabelecido que durante as próximas introduções todos os exemplares resistentes seriam marcados para se estimar a densidade populacional tanto da linhagem local como da introduzida. Por meio da marcação foi possível verificar que após os 15 dias da introdução, grande parte dos caramujos capturados no Córrego Lava Pés e no córrego da Chácara Santa Inês eram *B. tenagophila* do Taim. Os dados moleculares obtidos com os filhotes coletados após 4 meses da introdução, confirmaram que a população resistente conseguiu se estabelecer nestas áreas, pois o patrimônio genético da linhagem do Taim estava presente em grande parte dos caramujos analisados. Estes caramujos podem ser oriundos do intercruzamento da linhagem resistente com a local (*B. tenagophila* do Taim com *B. tenagophila* local) ou do cruzamento entre indivíduos da linhagem resistente (*B. tenagophila* do Taim com *B. tenagophila* do Taim). Como no Córrego São José do Retiro a população resistente estava em desvantagem numérica, pois grande parte dos exemplares capturados após os 15 dias da introdução eram caramujos locais, o material genético da linhagem *B. tenagophila* do Taim não foi transmitido com eficiência, apenas 3% dos caramujos analisados após 4 meses apresentaram a banda de 350 pb.

Estes resultados mostram que há uma correlação direta entre a proporção de exemplares introduzidos e locais e o sucesso da introdução do patrimônio genético da linhagem resistente. Os resultados obtidos no campo foram semelhantes aos dados obtidos no laboratório, que mostram que *B. tenagophila* da linhagem Taim quando em superioridade numérica são capazes de introduzir, de maneira significativa, o seu patrimônio genético a outras linhagens de *B. tenagophila* (ROSA ET AL., 2006). Também é importante considerar que a linhagem resistente e seus descendentes apresentaram elevada fecundidade e fertilidade em situações de laboratório e este comportamento pode se repetir no campo.

O marcador de 350 pb de caráter dominante na região espaçadora interna do RNA ribossomal de *B. tenagophila* da linhagem do Taim tem sido uma ferramenta essencial para monitorar os caramujos das áreas sob intervenção. As áreas onde ocorreram as introduções continuam sendo monitoradas através de coletas periódicas com o objetivo de verificar a permanência do patrimônio genético da linhagem resistente. Esta é uma medida importante, pois a expectativa é que haja o predomínio do material genético da linhagem resistente em função do tempo. Também estão previstas novas introduções da linhagem resistente nos locais para reforçar a pressão para intercruzamentos com caramujos locais remanescentes.

O resultado obtido no córrego São José do Retiro, onde praticamente não identificamos a presença do patrimônio genético da linhagem Taim após 4 meses da introdução inicial, talvez possa ajudar no entendimento da falta de sucesso das primeiras introduções onde é provável que o número de *B. tenagophila* do Taim introduzido não era suficiente para transferir o patrimônio genético à população local. Este tipo de estudo foi importante para reforçar a necessidade do uso de moluscicida em áreas onde há uma alta densidade populacional de caramujos locais, pois esta medida aumentaria a probabilidade de intercruzamento dos caramujos locais sobreviventes com a linhagem resistente. A introdução

da linhagem do Taim, com a utilização prévia do moluscicida, não representaria problema ecológico relevante, por tratar-se da mesma espécie de organismo já presente no ecossistema e o ambiente já estaria bastante alterado e descaracterizado por intervenções humanas, tais como: aterros, desvios de curso, alterações na vegetação aquática e, principalmente, pela descarga de esgotos domésticos.

A alta densidade populacional de *B. tenagophila* local sempre foi motivo de preocupação do nosso grupo quanto ao sucesso da inserção do material genético da linhagem resistente, por meio de intercruzamento com linhagem local. Fatores climáticos como chuva e temperatura, podem causar flutuações na distribuição, tamanho e densidade das populações de caramujos do gênero *Biomphalaria* (BARBOSA & BARBOSA, 1994). A presença, ausência e até mesmo a variação da vegetação também pode interferir na densidade populacional dos moluscos (STURROCK, 1974; PIERE, 1995). A vegetação pode servir como substrato para a colocação de desovas, para alimentação ou até mesmo proteger contra fenômenos adversos como radiação solar, altas temperaturas e correntezas fortes. Os fatores físico-químicos, tais como pH da água, turbidez, concentração  $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{Mg}^{++}$ , valores de nitrogênio (amônia), níveis de  $\text{O}_2$ , também podem exercer alguma influência na abundância ou escassez dos moluscos do gênero *Biomphalaria* em um determinado ambiente (PIERE, 1995). Estudos conduzidos por TELES ET AL (2002) demonstraram que a densidade populacional de *B. tenagophila* de Bananal é influenciada negativamente pelas chuvas, pois aumenta o volume das coleções hídricas e provoca o arraste dos moluscos. Por outro lado, a estiagem favorece o aumento populacional dos moluscos bem como o surgimento de caramujos infectados e no inverno sem chuvas, as altas densidades de *B. tenagophila* permanecem.

Os testes de suscetibilidade realizados em condições de laboratório são essenciais para avaliar o efeito da introdução da linhagem resistente sobre a transmissão do parasito, após as intervenções. No caso do município de Bananal está avaliação apresenta uma complicação, pois os caramujos locais, mesmo antes das introduções apresentam baixos índices de suscetibilidade à cepa S.J de *S. mansoni*. (2%). A grande variação dos moluscos a diferentes cepas de *S. mansoni* é bem documentada na literatura, sendo sempre descrita maior suscetibilidade dos caramujos com cepas locais do parasito (CHIEFFI, 1975; CÔRREA ET AL., 1979). Desta forma estamos tentando isolar a cepa de *S. mansoni* de pessoas infectadas ou caramujos coletados em Bananal. A dificuldade de se isolar a cepa de *S. mansoni* em Bananal é que devido às campanhas de controle realizadas durante o período de 1998-2001, a prevalência da doença foi reduzida para níveis inferiores a 1% e as taxas de infecção natural de *B. tenagophila* de Bananal não ultrapassavam a 0,2% (TELES ET AL., 2002). Enfim, a baixa taxa de suscetibilidade de *B. tenagophila* coletados em Bananal à infecção experimental com *S. mansoni* da cepa SJ aliado ao pequeno número de caramujos testados até o momento não nos permite inferir que a introdução de *B. tenagophila* da linhagem do Taim resultou em alteração da suscetibilidade à infecção por *S. mansoni* nos moluscos presentes nas áreas experimentais.

Este trabalho demonstrou que a introdução em larga escala da linhagem do Taim em áreas onde *B. tenagophila* é a principal espécie transmissora constitui uma estratégia de controle de possível realização, entretanto este método de controle biológico ainda precisa ser testado em áreas de alta endemicidade, principalmente com o uso do moluscicida. Após a validação do modelo de controle novas estratégias poderão ser criadas para a utilização em larga escala da linhagem resistente *B. tenagophila* do Taim. As nossas perspectivas são que

este modelo possa ser utilizado como complemento às práticas de controle da esquistossomose no Brasil.

## 12- CONCLUSÕES

O fragmento de 350 pb, típico da população *B. tenagophila* do Taim é dominante e apesar de não estar relacionado com a resistência, foi de grande importância para monitoramento da inserção da herança genética da linhagem do Taim após as introduções no campo.

As progênies F1 e F2 obtidas do cruzamento da linhagem *B. tenagophila* do Taim e *B. tenagophila* de Joinville apresentaram elementos do sistema interna de defesa (hemócitos e hemolinfa) altamente eficientes na destruição dos esporocistos cultivados *in vitro*.

Estudos realizados em laboratório com populações mistas de *B. tenagophila*, formadas por indivíduos resistentes e suscetíveis, demonstraram que mesmo em situações nas quais a linhagem resistente *B. tenagophila* do Taim estava em desvantagem, o caráter resistência foi transmitido com eficiência para os indivíduos das progênies F1, F2 e F3. Neste mesmo estudo foi observado que a linhagem resistente apresentou um melhor desempenho reprodutivo do que a suscetível.

O modelo de controle biológico mediante a introdução em larga escala da linhagem resistente *B. tenagophila* do Taim no município de Bananal demonstrou que há uma correlação direta entre a proporção de caramujos locais e introduzidos para o sucesso da introdução do patrimônio genético da linhagem resistente. Nas áreas de baixa densidade populacional da linhagem local de *B. tenagophila*, a linhagem resistente foi capaz de se estabelecer e transmitir aos caramujos locais o seu material genético, pois o fragmento de 350pb foi identificado em grandes percentagens dos caramujos analisados, após o período de 4 meses de intervenção. Por outro lado, nas áreas de alta densidade populacional da linhagem

local, o marcador molecular de 350 pb foi detectado em uma minoria de caramujos. Estes dados reforçam a importância da utilização prévia do moluscicida para o sucesso do modelo.

Este método de controle biológico ainda precisa ser testado em áreas de alta endemicidade, principalmente com o uso do moluscicida. Após a validação do modelo de controle novas estratégias poderão ser criadas para a utilização em larga escala da linhagem resistente *B. tenagophila* do Taim. As nossas perspectivas são que este modelo possa ser utilizado como complemento às práticas de controle da esquistossomose no Brasil.

## REFERÊNCIAS

ABÍLIO, F. J. P. *Gastrópodes e outros invertebrados bentônicos do sedimento litorâneo e associado à macrófitas aquáticas em açudes do semi-árido paraibano, nordeste do Brasil*. 2002. 179 p. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

ALARCÓN DE NOYA, B.; BALZAN, C.; ARTEAGA, C.; CESARI, I.; NOYA, O. The last fifteen years of schistosomiasis in Venezuela: features and evolution. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 94, p. 139-146, 1995.

ANDERSON, C.; GOBERT, E. Des mesures prophylactiques applicables contre la bilharzioses en Tunisie. *Archh. Inst. Pasteur Tunis*, v. 13, 125-128, 1924.

ANDRADE, E. M.; ANTUNES, C. M. F. Combate biológico- *Tilapia melanopleura* versus *Biomphalaria glabrata* (Say), em condições de laboratório. *Rev. Brasil. de Malar. Doenças Trop.* v. 21, p. 49-58. 1969.

ANDRADE, R. M. Nota ecológica sobre o lago da Pampulha (Belo Horizonte-MG), com especial referência aos planorbídeos (Pulmonata, Planorbidae) *Rev. Brasil. Malar. Doenças Trop.* v. 21, p. 59-116. 1968.

ARANTES, A. Onze casos autóctones de esquistossomose em Santos. *Bol. Soc. Med. Cir. S. Paulo.* v. 7, p. 64-65, 1924.

BARBOSA, C. S.; BARBOSA, F. S. *Controle biológico dos moluscos transmissores da esquistossomose: A competição Interespecífica Biomphalaria glabrata X Biomphalaria straminea*. In: BARBOSA, F. S. *Tópicos em Malacologia Médica*, Ed. Fiocruz. p. 221-2238, 1995.

BARBOSA, F. S. Epidemiologia. In: A. S. CUNHA, *Esquistossomose mansoni*. Ed. Sarvier & USP, p.31-59, 1970.

BARBOSA, F. S.; BARBOSA, C. S. The bioecology of snail vectors for Schistosomiasis in Brazil. *Cad. Saúde Publi*, v. 10, p-200-209, 1994.

BARBOSA, F. S.; BARBOSA, C. S. Controle Biológico dos moluscos tranmissores da equistossomose: Competição interespecífica *Biomphalaria glabrata* X *Biomphalaria straminea*. In: BARBOSA, F. S. *Tópicos em Malacologia Médica*, Ed. Fiocruz. p. 221-238, 1995.

BARBOSA, F. S.; BARRETO, A. C. Differences in susceptibility of Brazilian strains of *Australorbis glabratus* to *Schistosoma mansoni*. *Exp. Parasitol*, v. 9, p.137-140, 1960.

- BARBOSA, F. S.; COELHO, M. V. Ação de dessecação sobre as fases larvárias intracaramujo de *Schistosoma mansoni* em *Australorbis glabratus*. *Publicações avulsas do Instituto Aggeu Magalhães*, v.11, p. 159-162. 1953
- BARBOSA, F. S; OLIVIER, L. Studies on the snail vectors of *Bilharziasis mansoni* in north-eastern brazil. *Bull. World Health Organ*, v. 18, p. 895-908, 1958.
- BARBOSA, L. CALDEIRA R. L; CARVALHO, O. S; VIDIGAL, T. H; JANOTTI- PASSOS, L. K; COELHO, P. M. Z. Resistance to *Schistosoma mansoni* by transplantation of APO *Biomphalaria tenagophila* . *Parasite Immun*, v. 286, p. 209-212, 2006.
- BARLOW, C. H.; MUENCH, H. Life span and monthly mortality rate of *Bulinus truncatus* and *Planorbis boissyi* the intermediate host of schistosomiasis in Egyty. *J. Parasitol*, v. 37, p165-1773, 1951.
- BAYNE, C. J., Molluscan immunobiology. In: SALEUDDIN, A. S. M.; WILBUR, K. M. *The Mollusca*. New York: Academic Press, vol.5, Parte 2. p. 407, 1983.
- BAYNE, C. J., Phagocytosis and non-self recognition in invertebrates. *Bio Science*, v. 40, p.723-731, 1990.
- BAYNE, C. J.; BUCKLEY, P. M. & DEWAN, P. C., Macrophagelike hemocytes of resistant *Biomphalaria glabrata* are cytotoxic for sporocysts of *Schistosoma mansoni* in vitro. *J. Parasitol*, v. 66, p. 413-419, 1980a.
- BAYNE C. J.; BUCKLEY P. M.; DEWAN P. C *Schistosoma mansoni*: Cytotoxicity of hemocytes from susceptible snail hosts for sporocysts in plasma from resistant *Biomphalaria glabrata*. *Exp. Parasitol*. 50: 409-416. 1980b.
- BAYNE, C. J.; LOKER, E. S.; YUI, M. A.; STEPHENS, J. A. Immune-recognition of *Schistosoma mansoni* primary sporocysts may require specific receptors on *Biomphalaria glabrata* hemocytes. *Parasite Immunol*, v. 6, p. 519-528. 1984
- BAYNE, C. J. Phagocytosis and non-self recognition in invertebrates. *BioScience*, v. 40, p. 723-731,1990.
- BERG, C. O. Sciomyzid larvae (Diptera) that feed on snails. *J. Parasit*, v. 39, p. 630-636, 1953.
- BERGHE, L. Sur un ciliate parasite de pontes de mollusques d' eau douce, *Glaucoma paedophthera*. *C. R. Soc. Biol*, v.115, p.1423, 1934.
- BERRY, E. G. A recently observed disease. *Ann. Rep. Amer. Malac. Union News Bull*. p. 10-11, 1949.

BEZERRA, F. S. M.; NOGUEIRA-MACHADO, J. A.; CHAVES, M. M.; MARTINS, R. L.; COELHO, P. M. Z. Quantification of the Number and Phagocytary Activity of Hemocytes of Resistant and Susceptible Strains of *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria tenagophila* infected with *Schistosoma mansoni*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 39, p.197-201, 1997.

BEZERRA, F. S. M.; NOGUEIRA-MACHADO, J. A.; MARTINS-SOUZA, R. L.; CHAVES, M. M.; CORRÊA, R. F.; COELHO, P. M. Z. Effect of gamma radiation on the activity of hemocytes and on the course of *Schistosoma mansoni* infection in resistant *Biomphalaria tenagophila* snails. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 98, p. 73-75, 2003.

BOROS, D. F. L & WARREN, K. S. Delayed hypersensitivity type granuloma formation and dermal reaction induced and elicited by soluble isolated from *Shistosoma mansoni* eggs. *J. Exp. Med.* v.132, p. 448-507, 1970.

BORDA, C. E.; REA, M. J. F. Susceptibilidad de *Biomphalaria tenagophila* de las cuencas de los ríos Paraná Y Uruguay a *Schistosoma mansoni*. *Rev Pan Salud Publica/ Pan Am J Public Health.* v. , p. 167-172, 1997.

BORDA, C. E.; REA, M. J. F *Biomphalaria tenagophila* potencial vector of *S. mansoni*: In the Paraná River basin (Argentina and Paraguai). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 102, p. 191-195, 2007.

BOUCHUT, A.; COUSTAU, C.; GOURBAL, B.; MITTA, G. Compatibility in the *Biomphalaria glabrata/ Echinostoma caproni* model: new candidate genes evidenced by a suppressive subtractive hybridization approach. *Parasitolog*, v. 134, p. 575-588, 2007.

BROOKS C. P A comparative study of *Schistosoma mansoni* in *Tropicorbis glabratus*. *J. Parasitol.*, v. 39, p. 159-163, 1953

BRUMPT, E. Observations biologiques diverses concernant *Planorbis (Australorbis) glabratus* hôte intermédiaire de *Schistosoma mansoni*. *Ann. Parasitolo*, v. 18, p. 9-45, 1941.

CALDEIRA, R. L., VIDIGAL, T. .H. D. A., PAULINELLI, S. T., SIMPSON, A. J. G. & CARVALHO, O. S. Molecular identification of similar species of the genus *Biomphalaria* (Mollusca, Planorbidae) determined by a PCR-RFLP. *Mem Inst Oswaldo Cruz* v. 93, p. 219-225. 1998.

CARVALHO, O. S.; NUNES, I. M.; CALDEIRA, R. L. First report of *Biomphalaria glabrata* in state of Rio Grande do Sul (Brazil). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.93, p. 39-40, 1998.

CARVALHO, O. S.; SOUZA, C. P.; KATZ, N. 1st finding of *Biomphalaria tenagophila* (D'Orbigny, 1835) naturally infected with *Schistosoma mansoni*, in Itajubá, in the south of the State of Minas Gerais, Brazil. *Rev. Saúde Pública*, v. 19, p. 88-91. 1985.

CARVALHO, O. S.; AMARAL, R.S.; DUTRA, L. V.; SCHOLTE, R.G. C.; GUERRA, M. A. M.G. Distribuição espacial de *Biomphalaria glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila*, hospedeiros intermediários de *Schistosoma mansoni* no Brasil. In: CARVALHO, O. S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H.F. *Schistosoma mansoni* *Esquistossomose uma visão multidisciplinar*. Ed. Fiocruz. p. 395-418, 2008.

CHAIA, G. Técnica para concentração de miracídios. *Rev. Bras. Malar. Doenç. Trop.* v. 8, p. 355-357, 1956.

CHERNIN, E. Behavioral responses of miracidia of *Schistosoma mansoni* and other trematodes to substances emitted by snails. *J. Parasitol.* p.287-296, 1970.

CHERNIN, E. Some host-finding attributes of *Schistosoma mansoni* miracidia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v.23, p. 320-327, 1974.

CHERNIN, E.; MICHELSON, E. H.; AUGUSTINE, D. L.; Studies on the biological control of Schistosome –bearing snails. Control of *Australorbis* populations by the snail *Marisa cornuarietis*, under laboratory conditions. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v, 5 p. 297-307. 1956

CHIEFFI, P. P. Susceptibilidade a infecção por *Schistosoma mansoni* de cepas de *Biomphalaria tenagophila* originárias dos estados de São Paulo e Paraná. *Rev. Med. Trop. São Paulo.* v.17, p.92-96, 1975.

CHIMBARI, M. J.; MADSEN, H.; NDAMBA, J. Laboratory experiments on snail predation by *Sargochromis codringtoni*, a candidate for biological control of the snails that transmit schistosomiasis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* v. 91, p.95-102, 1997.

COELHO, M. V. Ação das formas larvárias do *Schistosoma mansoni* sobre a reprodução de *Australorbis glabratus*. *Publicações Avulsas do Instituto Aggeu Magalhães*, v. 3, p. 39-54, 1954.

COELHO, M. V. & BARBOSA, F. S. Qualidades de vetor dos hospedeiros de *Schistosoma mansoni* no Nordeste do Brasil. Duração da infestação e eliminação de cercárias em *Tropicorbis centimetralis*. *Publicações Avulsas do Instituto Aggeu Magalhães*, v. 5, p. 21-30, 1956.

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

COELHO, JR.; BEZERRA, F. S. Compatibility of *Biomphalaria tenagophila* with *Schistosoma mansoni*: a study of homologous plasma transference. *Mem Inst OswaldoCruz*, v. 101, p.111-112. 2006

COELHO, P. M. Z. Resistência e susceptibilidade à infecção por *Schistosoma mansoni* em caramujos do gênero *Biomphalaria*. In: BARBOSA, F. S. *Tópicos em Malacologia Médica*, Ed. Fiocruz. p. 208-217, 1995.

COELHO, P. M. Z.; ANDRADE, Z. A.; BORGES, C. M.C; RIBEIRO, F. BARBOSA, L. Evolução de *Schistosoma mansoni* no hospedeiro intermediário. In: CARVALHO, O. S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H.F. *Schistosoma mansoni Esquistossomose uma visão multidisciplinar*. Ed. Fiocruz. p. 149-160, 2008.

COELHO, P. M. Z.; BOSON, F. C. B.; GERKEN, S. E. Potencialidade de predação à *Biomphalaria glabrata*: (Say, 1818) por duas espécies de quelônios sul-americanos: *Platemys spixii* (Duméril e Dabron, 1935) e *Chrysemys (Trachemys) dorbigni* (Duméril e Dabron, 1935). *Ciência e cult.* v. 27, p. 301-303. 1975

COELHO, P. M. Z.; GERKEN, E. S.; FREITAS, J. R. Avaliação de populações de planorbídeos em habitats naturais, pelo método de perfuração da concha. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 28, p. 74-79.1986.

COELHO, P. M. Z.; CARVALHO, O. S.; ANDRADE, Z. A.; MARTINS-SOUSA, R. L.; ROSA, F. M.; BARBOSA, L.; PEREIRA, C. A. J.; CALDEIRA, R. L.; PASSOS, L. J.; GODARD, A.L. B, MOREIRA, L. A.; OLIVEIRA, G. C, FRANCO, G. R, TELES, H. M. S, NEGRÃO-CÔRREA, D. *Biomphalaria tenagophila/Schistosoma mansoni* interaction: Current Knowledge and Perspectives for its Application on the Control of Schistosomiasis mansoni. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 99 (Suppl. 1) p. 109-111. 2004.

COELHO, P.; ROSA, F.; MACIEL, E.; NEGRÃO-CORRÊA, D.; CARVALHO, O.; CALDEIRA, R.; JANNOTTI-PASSOS, L.; MOREIRA, L.; OLIVEIRA, G.; TELES, H. Transmission control of schistosomiasis mansoni by introduction of a resistant strain of *Biomphalaria tenagophila* in areas where transmission is maintained by this species. *Acta Tropica*, 2008. (in press)

CONSOLI, R. A.; GUIMARÃES, C. T., DO CARMO, J. A.; SOARES, D. M.; DOS SANTOS, J. S.; *Aedes fluviatilis* (Diptera: Culicidae) and *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Planorbidae). *Mem. Inst. Oswaldo cruz*, v. 86, p. 419-424, 1991.

COOPER, L.A.; LARSON, S. E.; LEWIS, F.A. Male reproductive success of *Schistosoma mansoni* infected *Biomphalaria glabrata* snails. *J. Parasitol*, v. 82, p. 428-431, 1996.

COOPER, L.A.; RICHARDS, C. S.; LEWIS, A.; MINCHELLA, D. J. *Schistosoma mansoni*: Relationship between low fecundity and reduced susceptibility to parasite infection in the snail *Biomphalaria glabrata*. *Exp. Parasitol.* v. 79, v. 79p. 21-28. 1994.

CORRÊA, L. R.; PARAENSE, W. L. Susceptibility of *Biomphalaria amazonica* to infection with two strains of *Schistosoma mansoni*. *Rev. Inst. Med. Top. São Paulo*; v. 13, p. 387-390, 1971.

CORRÊA, M. C. R.; COELHO, P. M. Z & FREITAS, J. R. Susceptibilidade de linhagens de *Biomphalaria tenagophila* e *B. glabrata* a duas cepas do *Shistosoma mansoni* (LE- Belo Horizonte, MG e SJ- São José dos Campos, SP). *Rev. Inst. Med.Trop. São Paulo*, v.21, p.72-76, 1979.

CORRÊA, R.R.; PIZA, J. T.; RAMOS, A. S, CAMARGO, L.V.; Planorbídeos de Estado de São Paulo, sua relação com a esquistossomose. (Pulmonata, Planorbidae). *Arq. Hig. Saúde Publ*, v. 27, p. 139-159. 1962

COSTA, M.J.F.S.; GRAULT, C. E; CONFALONIERI, U.E.C. Comparative study of the fecundity and fertility of *B. glabrata* (Say,1818) and *B. straminea* (Dunker,1848) in laboratory through self- fertilization and cross- fertilization. *Mem. Inst. Oswaldo cruz*, v. 99, p. 13-19, 2004.

COURA, J. R & AMARAL, R. S. Epidemiological and control aspects of Schistosomiasis in Brazilian Endemic Areas. *Mem. Inst.Oswaldo Cruz*. v. 99, suppl 1, p. 13-19, 2004.

COWPER, S. G. Some notes on the maintenance and breeding of schistosome vectors in Great Britain, with special reference to *Planorbis guadaloupensis*. *Ann. Trop. Med. Parasit*, v. 40, p. 163-170, 1946.

DESCHIENS, R.; LAMY, L. Action prédatrice des écrivisses des genre *Astacus* et *Cambarus* sur les mollusques vecteurs des bilharzioses. *Bull. Soc. Path. Exot*, v. 47, p. 809-812, 1954.

DESCHIENS, R.; LAMY, L. Préhension et digestion des mollusques vecteurs des bilharzioses par les écrivisses du genre *Cambarus*. *Bull. Soc. Path. Exot*, v. 48, p. 201-203, 1955.

DIAS, E., Isolamento e seleção de microorganismos de planorbídeos utilizáveis em ensaios de luta biológica contra estes invertebrados. *Hosp*, v. 47, p. 111-116, 1955.

DUCLERMOTIER, P.; LARDANS, V.; SERRA, E.; TROTTEIN, F.; DISSOUS, C.; *Biomphalaria glabrata* embryonic cells express a protein with a domain homologous to the lectin domain of mammalian selectins. *Parasitol Res*. v. 85, p. 481- 486. 1999.

DUKE, B.O.L. The route of emergence of the cercariae of *Schistosoma mansoni* from *Australorbiis glabratus*. *J. Helminth*, v. 55, p. 133-146, 1952.

ETGES, F. J.; GRESSO, W. Effect of *Schistosoma mansoni* infection upon fecundity in *Australorbiis glabratus*. *J. Parasitol*. v. 51 ,p.757-760.1965.

- FAUST, E. C & HOFFMANN, W. A. Studies on schistosomiasis mansoni in Puerto Rico. The extramamalian phases on lyfe cycle. *Puerto Rico J.Pub.Health Trop. Med*, v.10, p.1-47, 1934.
- FERGUSON, F. F.; PALMER, J. R. Biological notes on *Marisa cornuarietis* , a predator of *Australorbis glabratus*, the snail in termediate host of schistosomiasis in Puerto Rico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v.7, p.640-642. 1958.
- FILES, V. S.; CRAM, E .B. A study on the comparative susceptibility of snail vectores to strains *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.*, v.35, p.555-560, 1949.
- FREITAS, J. R. *Ritmo de crescimento da Biomphalaria glabrata (Say,1818), padronização da técnica de criação.*1973. 108p. Tese (Doutorado em Parasitologia), Instituto de Ciências biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- FREITAS, J. R.; BOSCHI, M. B.; SANTOS, M. B. L. Suscetibilidade de “híbridos” de *Biomphalaria tenagophila* à cepa LE (BH) do *Schistosoma mansoni*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* v, 1, p.6-12, 1985.
- FRYER, S. E.; BAYNE, C. J.; Phagocytosis of latex beads by *Biomphalaria glabrata* hemocytes is modulated in a strain- specific manner by absorbed plasma components. *Develop. Comp. Immunol.*, v. 20, p.233-337,1996.,
- GLASSER, C. M, Schistosomiasis control in the State of São Paulo. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 90, p. 307-309.1995
- GOLDMAN, M. A.; LOVERDE, P. T. Chromosomal evolution in planorbid snails of the genera *Bulinus* and *Biomphalaria*. *Malacol*, v.25, p. 427-446, 1984.
- GORDON, R. M. & GRIFFITHS, R. B. Observation on the means by which the cercariae of *S. mansoni* penetrate mammalian skin together with an account of certain morphological changes observed in the newly pnetrated larvae. *Ann. Trop. Med.* v.45,p. 227-243, 1951.
- GOUVEA, J. A. V.; MOTTA, J. G. Capacidade malacófaga de alguns peixes. *Gaz. Méd. Bahia*, v. 71 p.52-54, 1971.
- GRANATH, W. O. JR.; YOSHINO, T. P.; *Schistosoma mansoni*: passive transfer of resistance by serum in the vector snail, *Biomphalaria glabrata*. *Exp Parasitol*, v. 58, p. 188-193, 1984.
- GUARALDO, A. M. A.; MAGALHÃES, L. A.; RANGEL, H. A.; PAREJA, G. Evolução dos esporoscistos de *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907) em *Biomphalaria tenagophila* (D Orbigny,1835). *Rev. Saúde Pública* v.15, p.436-448, 1981.

GUILLOU, F.; ROGER, E.; MONÉ, Y. ROGNON, A.; GRUNAU, C.; THÉRON, A.; MITTA, G.; COUSTAU, C.; GOURBAL, B. E.; Excretory-secretory proteome of larval *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma caproni*, two parasites of *Biomphalaria glabrata*. *Mol Biochem Parasitol*, v. 155, p. 45-56, 2007

HARIDI, A. A.; EL SAFI, S. H.; JOBIN, W. R. Survival growth and reproduction of the imported ampullariid snail *Marisa cornuarietis* in Central Sudam. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v.38, p. 135-144. 1985.

HOLLANDE, A.; CHABELARD, R. Essai de lutte biologique par “*Dimoeriopsis destructor*” hollande et pesson (Protozaire: flagelle) contre les bilharzioses et les distomatoses. *Minerv. Urol.*, v.5 p.145, 1953.

HORA, S. L. Control of molluscan fauna through the culture of *Panagasius panagasius*. *Current Sciense*, v. 21, p. 164-165, 1952.

JOUDANE, J.; THERON, A.; COMBES, C. Demonstration of several sporocysts generations as a normal pattern of reproduction of *Schistosoma mansoni*. *Acta Tropica*, v. 37, p. 177-182, 1980.  
KANE, R. A.; ROLLISON, D. Repetitive sequences in the ribosomal DNA internal transcribed spacer of *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma intercalatum* and *Schistosoma mattheii*. *Mol. Bioch. Parasitol*, v. 63, p 153-156, 2004.

KATZ, N.; PEIXOTO, S.V. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* v. 33, n. 3, p.303-308, 2000.

KAWAZOE, U. Alguns aspectos da biologia de *Biomphalaria glabrata* (Say,1818) e *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny,1835) Pulmonata, planorbidae). I- Duração do período embrionário. *Rev. Saúde púb. S. Paulo*, v. 10, p.57-64, 1976.

KAWAZOE, U. Alguns aspectos da biologia de *Biomphalaria glabrata* (Say,1818) e *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny,1835) Pulmonata, planorbidae). II- Fecundidade e Fertilidade. *Rev. Saúde púb. S. Paulo*, v. 10, p.47-64, 1977.

KNIGHT, M.; ONGELE, E.; LEWIS, A. F. Molecular studies of *Biomphalaria glabrata*, an intermediate host of *Schistosoma mansoni*. *Inter J Parasitol* , v. 30, p. 525-541, 2000.

KUNTZ, R. E. Exposure of planorbid snails from the Western Hemisphere to miracidia of the Egyptian strain of *Schistosoma mansoni*. *Proc.Helmin. Soc Washington*, v.19, p. 9-15, 1952.

LAGRANGE, E. La lutte biologique contre les planorbides. *Ann. Soc. Belge. Med. Trop.* v.33, p.227-236. 1953.

LAGRANGE, E.; FAIN, A.. Sur un nouveau predateur des mollusques pulmones d ' eau douce transmetteurs de lla bilharziose. *Ann. Soc. Belge. Med. Trop*, v. 32, p.53-55, 1952.

- LEWIS, F. ; PATTERSON C. N., GRZWACZ, C. Parasite- susceptibility phenotypes of F1 *Biomphalaria glabrata* progeny derived from interbreeding *Schistosoma mansoni*-resistant and susceptible snails. *Parasitol Res.* v.89, p. 98-101. 2003
- LIE, K. J.; JEONG, K. H.; HEYNEMAN, D. Molluscan host reactions to helminthic infection. In: SOULSBY, E. J. L., Protozoa, Arthropods and Invertebrates, 211-270, *CRC-Prees INC*, Boca Raton, Florida, USA. 1987
- LOCKYER, A. E.; NOBLE, L. R.; ROLLISON, D.; JONES, C. S. *Schistosoma mansoni*: resistant specific infection-induced gene expression in *Biomphalaria glabrata* identified by fluorescent-based differential display. *Exp Parasitol*, v. 107, p. 97-104, 2004.
- LOKER. E. S.; YUI. M. A.; BAYNE. C. J. *Schistosoma mansoni*: Agglutination of sporocysts, and formation of gels on miracidia transforming in plasma of *Biomphalaria glabrata*. *Exp. Parasitol.* v. 58, p. 56-62, 1984.
- LUTZ, A. *Schistosoma mansoni e a Schistosomatose segundo observações feitas no Brasil.* *Mem. do Inst. Oswaldo Cruz*, v. 11, p.121-155, 1919.
- MADSEN, H. Biological methods for the control of freshwater snails. *Parasitol. Today*, v. 6, p. 237-241, 1990.
- MAGALHÃES, L. A.; CARVALHO, J. F. Estudo de postura de duas populações de planorbídeos. *Rev. Soc. Bras. Med. trop*, v. 3, p. 245-247, 1969.
- MAGALHÃES, L. A.; DE LUCCA, O. Determinação do período de desenvolvimento e da viabilidade das desovas de duas populações de *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria tenagophila* (Mollusca, Planorbidae). *Rev. Soc. Bras. Med. trop*, v. 5, p. 307-313, 1971.
- MALDONADO, J. F & ACOSTA-MATIENZO, J. The development of *Schistosoma mansoni* in the snails intermediate host *Australorbis glabratus*. *Puerto Rico J.Pub.Health Trop. Med*, v.22, p. 331-373, 1947.
- MARIA, M.; PELLEGRINO,J.; OKABE, K. Predatory activity of *Luciola cruciata* larvae on newly hatched *Biomphalaria glabrata*. *Mushi*, v.41, p.121-122, 1967.
- MARTINS-SOUZA, R. L., *Caracterização fenotípica e funcional de hemócitos circulantes de Biomphalaria glabrata e Biomphalaria tenagophila linhagens resistentes susceptíveis durante infecção por Schistosoma mansoni.* 2006.166 p. Tese (Doutorado em Parasitologia) Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- MARTINS-SOUZA, R. L., *Fatores associados à resistência de Biomphalaria tenagophila na infecção por Schistosoma mansoni.*1999.83 p. Dissertação de Mestrado defendida no Departamento de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MARTINS-SOUZA, R. L.; PEREIRA, C. A.; COELHO, P. M. Z.; NEGRÃO-CORRÊA, D. Silica treatment increases the susceptibility of the Cabo Frio strain of *Biomphalaria tenagophila* to *Schistosoma mansoni* infection but does not alter the natural resistance of the Taim strain. *Parasitol Res*, v. 91, p. 500-507, 2003.

MELO, A. L.; PEREIRA, L. H.; On the finding of *Biomphalaria tenagophila* naturally infected with *Schistosoma mansoni* in the State of Minas Gerais, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, v.27, p. 99-101,1985.

MICHELSON, E. H. An acid-fast pathogen of freshwater snails. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, v. 10, p. 423-427, 1961.

MILLER, N. A.; RAGHAVAN, N.; FITZGERALD, P. C.; LEWIS, F. A, KNIGHT, M Differential gene expression in haemocytes of the snail *Biomphalaria glabrata* effects of *Schistosoma mansoni* infection.. *Intern J. Parasitol* 31: 687-696.2001

MILWARD- DE – ANDRADE, R. Notes on laboratory and field observations regarding planorbides competitors and predators: Protozoans, Crustaceans and Mollusks. *Rev. Bras. Malar. Doenç. Trop*, v.23, p.193-194, 1971.

MILWARD- DE ANDRADE, R.; GUIMARÃES, C. T Controle biológico de *Biomphalaria glabrata* (Say,1818) após a introdução de *Pomacea haustorium* (Reeve,1856) em Calciolândia, MG. *Ciência e cult*. v. 19, p. 786. 1974.

MINCHELLA, D. J.; LOVERDE, P. T. Laboratory compararisons of relative sucesssof *Biomphalaria glabrata* stocks wich are susceptible and insusceptible to infection with *Schistosoma mansoni*. *Parasitol*. v.86, p. 335-344. 1983.

MITTA, G.; GALINIER, R.; TISSEYRE, P.; ALLIENNE, J. F.; GIRERD-CHAMBAZ, Y.; GUILLOU, F.; BOUCHUT, A.; COUSTAU, C. Gene discovery and expression analysis of immune-relevant genes from *Biomphalaria glabrata* hemocytes. *Dev. Comp. Immunol*, v.29, p. 393-407, 2005.

NEGRÃO-CORRÊA, D.; PEREIRA, C. A; ROSA, F. M.; MARTINS-SOUZA, R. L.; ANDRADE, Z. A.; COELHO, P. M. Z. Molluscan response to parasite: *Biomphalaria* and *Schistosoma mansoni* interaction. *ISJ*, v. 4, p.101-111. 2007

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

NEWTON, W. L. The inheritance of suscptibility to infetion with *Schistosoma mansoni* in *Australorbis glabratus*. *Exp. Parasitol*, v. 2, p. 242- 257, 1952.

OKADA, Y. K. Two japanese aquatic glowworms. *Trans. Ent. Soc. Lodon*, v. 76, p. 101-108, 1928.

OLIVEIRA, A.L.D.; SIVA, D. DA; ZANOTTI-MAGALÃES, E. M.; ABDEL-HAMID, A.Z.; RIBEIRO-PAES, J. T. Schistosome/mollusk: genetic compatibility. *Genetics and molecular Research*; v.7, p.518-526, 2008.

OLIVER, L & MAO, C. P. The early larval stages of *Schistosoma mansoni* (Sambon,1907) in the snails host *Australorbis glabratus* (Say, 1818). *J. Parasitol*, v.35 p.267-275, 1949.

OLIVER, L.; BARBOSA, F. S.; COELHO, M. V. The influence of infection with *Schistosoma mansoni* on survival of *Australorbis glabratus*. *Publicações Avulsas do Instituto Aggeu Magalhães*, v. 3, p 63-71.1954.

OLIVER-GONZALEZ, FERGUSON, F. F. Probable biological control of Schistosomiasis mansoni in a Puerto Rican water-shed. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v.8, p. 56-59, 1959.

OLIVER-GONZALEZ, J. The possible role of the guppy, *Lebistes reticulatus*, on the biological control of *Schistosoma mansoni*. *Science*, v. 104 , p. 605, 1946.

OLIVER-GONZALEZ, J.; BAUMAN, P. M.; BENENSON, A. S. Effect of the snail *Marisa cornuarietis* on *Australorbis glabratus* on natural bodies of water in Puerto Rico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v.5, p.290-296, 1956.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). *O controle da esquistossomose: segundo relatório do comitê de especialistas da OMS*. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 1993. 110 p. (Technical Reports Series, 830).

PAN, C. Studies on the host- parasite relationship between *Schistosoma mansoni* and the snail *Australorbis glabratus*. *Am.J. Trop. Med. Hyg.* v. 14, p. 931-976,1965

PARAENSE, W. L. Autofecundação e fecundação cruzada em *Australorbis glabratus*. *Mem. do Inst. Oswaldo Cruz*, v. 53, p.277-284, 1955.

PARAENSE, W. L. *Control of Schistosomiasis mansoni: an outlook from current expectation*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 82, p. 1-12, 1987b.

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

PARAENSE, W. L. Susceptibility of *Biomphalaria peregrina* from Brazil and Ecuador to two strains of *Schistosoma mansoni*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.15, p. 127-130, 1973.

PARAENSE, W. L.; ARAÚJO, M. V. *Biomphalaria glabrata* in the state of Piauí. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 79, p. 385-387, 1984.

- PARAENSE, W. L.; CORRÊA, L. R. Differential susceptibility of *Biomphalaria tenagophila* populations to infection with a strain of *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol*, v. 64, p. 822-826, 1978.
- PARAENSE, W. L.; CORREA, L. R. Probable extension of schistosomiasis mansoni to southern Brazil. *Mem. Inst.Oswaldo Cruz*, v.82, p.577- 1987a.
- PARAENSE, W. The schistosome vectors in the americas. *Mem. Inst.Oswaldo Cruz*, v. 96, supl, p. 7-16, 2001.
- PARAENSE, W. L; CORRÊA, L. R. Variation in susceptibility of populations of *Australorbis glabratus* to a strain of *Schistosoma mansoni*. *Rev .Inst. Med Trop. São Paulo*, v.5, p.15-22, 1963.
- PARAENSE, W. L; DESLANDES, N. Observations on the morphology of *Australorbis glabratus*. *Mem. Inst.Oswaldo Cruz*, v.53, p.87- 103, 1955.
- PAULINYI, H. M.; PAULINI, E. Laboratory observations on the biological control of *Biomphalaria glabrata* by *Pomacea* (Ampullariidae). *Bull. WHO*, v.46, p. 243- 247.1972.
- PELLEGRINO, J.; MACEDO, D. G; A simplified method for the concentration of cercarial. *J. Parasitol*, v.41, p. 306-309, 1955.
- PELLEGRINO, J.; KATZ, N. Experimental chemotherapy of *Schistosomiasis mansoni*. *Adv. Parasitol*, v. 6, p.233-290, 1968.
- PEREIRA C.A.J., MARTINS-SOUZA, R. L., CORRÊA JR., A, COELHO, P. M. Z., NEGRÃO-CORRÊA, D The participation of cell-free hemolymph of *Biomphalaria tenagophila* in the defense mechanism against to *Schistosoma mansoni* sporocysts. *Parasite Immunology*, v.30, p. 610-619, 2008.
- PEREIRA CA, MARTINS-SOUZA RL, COELHO PM, LIMA WS, NEGRÃO-CORRÊA D. Effect of *Angiostrongylus vasorum* infection on *Biomphalaria tenagophila* susceptibility to *Schistosoma mansoni*. *Acta Trop*.v. 98, p.224-233, 2006.
- PEREIRA, L. H; VALADARES, T. E.; CUNHA, M. L.; CORREA, M. C. Recovery of young daughter sporocysts from snails infected whith *Schistosoma mansoni*. *Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg*; v. 78, n.4, p.563, 1984.
- PERLOWAGORA, S. A.Studies on the biology of *Australorbis glabratus*, *Schistosome*-bearing Brazilian snail. *Rev. Bras. Malcariol. Doenças Trop*, v.10, p. 459-531, 1958
- PIERI, O. S. Perspectiva no controle ambiental dos moluscos vetores da esquistossomose. In: BARBOSA, F. S. *Tópicos em Malacologia Médica*, Ed. Fiocruz. p. 221-239, 1995.

PILSBRY, H. A. Review of the Planorbidae of Florida, with notes on other members of the family. *Proc. Acad. Nat. Sci. Phila*, v. 86, p.29-66, 1934.

PIZA, J. T.; RAMOS, A.S, MORAES, L.V.C, CORRÊA, R.R.; TAKAKU, L.; PINTO, A. C. M. Carta planorbíca do Estado de São Paulo. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 1972.

PIZA, J. T. I. Expansão da esquistossomose em São Paulo. II. Medidas adotadas para o seu controle. 28a Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, Brasília, 1975.

PONTIER, J. P.; JOURDANE, J. Biological control of the snail hosts of schistosomiasis in areas of low transmission: the example of the Caribbean area. *Acta Trop.* v.77, p.53-60, 2000.

PRATT, I.; BARTON, G. D. The effects of four species of larval trematodes upon the liver and ovostestes of the snail *Stagnicola emarginata angulata* (Sowerby). *J. Parasitol.* v. 27,p.281-288.1941

RAGHAVAN, N.; MILLER, A. N.; GARDNER, M.; FITZGERALD, P. C.; KERLAVAGE, A. R.; JOHNSTON, D. A.; LEWIS, F. A.; KNIGHT, M. Comparative gene analysis of *Biomphalaria glabrata* hemocytes pre- and post-exposure to miracidia of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol*, v. 126, p.181-191, 2003.

RAGHAVAN, N., KNIGHT, M. The snail (*Biomphalaria glabrata*) genome project. *Trends Parasitol*, v.22, p. 148-51, 2006

REY, L. *Contribuição para o conhecimento da morfologia, biologia e ecologia dos planorbídeos brasileiros transmissores da esquistossomose*. Rio de Janeiro: Serviço Nacional de Educação Sanitária, 1956. 217 p.

RICHARDS, C. S. Genetic factors in susceptibility of *Biomphalaria glabrata* for different strains of *Schistosoma mansoni*. *Parasitol.* v. 70, p. 231-241, 1975.

RICHARDS, C. S. Genetics studies of a molluscan vector of schistosomiasis. *Nature*, v. 227, p. 806-810, 1970.

RICHARDS, C. S. Susceptibility of adult *Biomphalaria glabrata* to *Schistosoma mansoni* infection. *Am. J. Trop. Med Hyg*, v.22, p. 748- 756, 1973 a .

RICHARDS, C. S. Susceptibility of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda:Planorbidae). *Malacol Review*, v.6, p. 199-202, 1973 b

- RICHARDS, C. S.; MERRITT, J. W. JR. Genetic factors in the susceptibility of juvenile *Biomphalaria glabrata* to *Schistosoma mansoni* infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*; v.21, p. 425-434, 1972.
- RICHARDS, C. S.; RENWANTZ, L. R. Two lectins on the surface of *Helix pomatia* haemocytes: a Ca<sup>2+</sup> dependent, GalNac-specific lectin and a Ca<sup>2+</sup> independent, mannose 6-phosphate-specific lectin which recognizes activated homologous opsonins. *J. Comp. Physiol.*, v. 161, p. 43, 1991.
- RICHARDS, C. S.; SHADE, P. C. The genetic variation of compatibility in *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni* infection. *J. Parasitol.*, v. 73, p. 1146-1151, 1987.
- ROSA, F. M.; CALDEIRA R. L.; CARVALHO, O. S., COELHO, P. M. Z. Dominant Character of the Molecular Marker of a *Biomphalaria tenagophila* strain (Mollusca: Planorbidae) Resistant to *Schistosoma mansoni*. *Mem. Inst Oswaldo Cruz*, v. 99, p. 85-87, 2004.
- ROSA, F. M.; GODARD, A. L. B.; AZEVEDO V.; COELHO, P. M. Z. *Biomphalaria tenagophila*: dominant character of the resistance to *Schistosoma mansoni* and descendants of cross-breeding between resistant (Taim, RS) and susceptible (Joinville, SC) strains. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 100, p. 19-23, 2005.
- ROSA, F. M.; GODARD, A. L. B.; RODRIGUES, H. Á.; CARVALHO, O. S.; CALDEIRA, R. L., TELES, H. M. S.; MACIEL, E.; PASSOS, L. J.; NEGRÃO-CÔRREA, COELHO, P. M. Z. 2006. *Biomphalaria tenagophila*: Dynamics of Populations of Resistant and Susceptible Strains to *Schistosoma mansoni*, with or without Pressure of the Parasite. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 101, supp 1, p.247-251, 2006
- SAMUELSON, J. C.; QUINN, J. J.; CAULFIELD, J. P. Hatching, chemokinesis and transformation of miracidia of *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.*, v.70, p.321-331. 1984
- SANTOS, M. B. L.; FREITAS, J. R.; CORREIA, M. C. R.; COELHO, P. M. Z. Suscetibilidade ao *Schistosoma mansoni* de híbridos de *Biomphalaria tenagophila* do Taim, RS, Cabo Frio, RJ, e Belo horizonte, MG. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 21, p.281-286, 1979.
- SANGUINETTI, J. C.; DIAS NETO, E.; SIMPSON, A. J. G. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Bio Techniques*, v. 5, p. 915-918 1994
- SILVA, R. E.; MELO, A. L.; PEREIRA, L. H. Susceptibility of *Biomphalaria tenagophila* and *Biomphalaria glabrata* from a same region to 2 *Schistosoma mansoni* strains. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, v. 36, p. 409-15, 1994 .
- SLUITERS, J.F., BRUSSAARD-WUST, C. M; MEULEMAN, E. A. The relationship between miracidial dose, production of cercariae, and reproductive activity of the host in the

combination *Trichobilharzia ocellata* and *Lyymnaea stagnalis*. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, v. 63, p.13-26. 1980

SOHN, I. G.; KORNICKER, L. S. Predation of schistosomiasis vector snails by *Ostracoda* (Crustacea). *Science*, v. 175, p. 1258-1259, 1972.

SOUZA, D.; CIARAVOLO, R. M. C.; YOHKO KA, H.; GARGIONI, C.; GONÇALVES, A. C. M.; PAULA, M. B. Esquistossomose mansônica no Estado de São Paulo: Aspectos Epidemiológicos. Informe Mensal sobre Agravos à Saúde Pública. Disponível em: < www.cve.saude.sp.gov.br/. Acesso em: 30 Agos. 2007.

STANDEN, O. Some observation upon maintenance of *Australorbis glabratus* in the laboratory. *Ann. Trop. Med. Parasitol*, v. 45, p. 80-83. 1951

STURROCK, R. F. Ecological notes on habitats of the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*, intermediate hosts of *Schistosoma mansoni* on St. Lucia, West Indies. *Carib J Sci*, v. 14, 149-162, 1974

SUCEN. Superintendência de Controle de Endemias. *Programa de controle da esquistossomose (1981-1992)*. São Paulo, 181 p, 1995.

SULLIVAN, J. T.; SPENCE, J. V.; Transfer of resistance to *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata* by allografts of amoebocyte-producing organ. *J Parasitol*, v. 80, p. 449-453, 1994.

TAFALLA, C.; GÓMEZ-LEON, J., NOVOA. B.; FIGUERAS, A. Nitric oxide production by carpet shell clam (*ruditapes decussates*) hemocytes. *Dev. Comp. Immunol*, v.27, p.197-2002.

TELES, H.M.S Distribution of *B. straminea* in the Southern neotropical region Brazil. *Rev. de Publica*, V. 30, P.341-349, 1996.

TELES, H.M.S *Estudo parasitológico, da transmissão e dos impactos da profilaxia da esquistossomose mansônica no município de Bananal, Estado de São Paulo, Brasil*. Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (IB/UNICAMP). Dissertação de mestrado, 72p., 2001.

TELES, H.M.S 2006. *Aspectos parasitológicos, imunológicos, epidemiológicos da esquistossomose mansônica no município de Bananal, Estado de São Paulo, Brasil*. Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (IB/UNICAMP). Tese doutorado, 72p, 2006.

TELES H. M. S.; HIRAMOTO, R. M.; OLIVEIRA, J. C. N., AVEIRO, J. A. Ocorrência de vetores da esquistossomose mansônica no litoral norte do Estado de São Paulo, Brasil. *Cad Saúde Públ* v. 19, :p. 1887-1891. .2003

- TELES, H. M. S. Distribuição geográfica das espécies dos caramujos transmissores de *Schistosoma mansoni* no Estado de São Paulo. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 38, p. 426-432, 2005.
- TELES, H. M. S.; FERREIRA, C. S.; CARVALHO, M. E.; LIMA, V. R.; ZACHARIAS, F. *Schistosomiasis mansoni* in Bananal (State of São Paulo, Brazil). II. Intermediate hosts. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 97 p. 37-41, 2002.
- TRIPP, M. R. Is *Bacillus pinottii* pathogenic in *Australorbis glabratus*. *J. Parasitol*, v.47, p.141, 1961.
- TRIGWELL, J. A.;DUSSART, G.B.J. Functional protandry in *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda: Pulmonata), an intermediate host of *Schistosoma*. *J. Moll. Stud*, v. 64, p. 253-256. 1998.
- VALADARES, T. E.; COELHO, P. M.; PELLEGRINO, J.; SAMPAIO, I. B. *Schistosoma mansoni*: Aspects of the oviposition of the LE' strain in mice infected with a couple of worms. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. V. 23, p. 6-11, 1981.
- VALLE, C.; PELLEGRINO, J., ALVARENGA, N. Ritmo circadiano de emergência de cercárias (. *Schistosoma mansoni*- *Biomphalaria glabrata*) . *Rev.Bras. Biol*, v. 31, p. 53-63,1971.
- VAN DER KNAAP, W. P. W. & LOKER, E. S. Immune mechanisms in Trematode-snails Interactions. *Parasitol. Today*, v. 6, p.175-182, 1990.
- VIDIGAL, T.H.D.A., SPATZ, L., NUNES, D.N., SIMPSON, A.J.G., CARVALHO, O.S. & DIAS NETO, E. *Biomphalaria* spp, identification of the intermediate snail hosts of *Schistosoma mansoni* by polymerase chain reaction simplification and restriction enzyme digestion of the ribosomal RNA gene Intergenic spacer. *Exp Parasitol*, v. 89, 180-187. 1998.
- VIDIGAL, T. H. D. A.; CALDEIRA, R. L.; SIMPSON, A. J. G.; CARVALHO, O..S. Futher studies on the molecular systematics of *Biomphalaria* snails from Brazil. . *Mem. Inst. Oswaldo cruz*, v. 95, p. 57-66, 2000
- VOELKER, J. Nutron, breeding, biology and life history of *Limnogeton fieberi*: Study of natural predator of tropical freshwater snails. *En. Mitt. Zool. Staatinst. u. Zool. Mus. Hamburg*, v. 3, p.1-24. 1968.
- WEINZETTL, M.; JUNBERG, P. Biological control of *Biomphalaria tenagophila* (Mollusca, Planorbidae), a schistosomiasis vector, using the fish *Geophagus brasiliensis* (Pisces, Cichlidae) in the laboratory or in a seminatural environment. *Mem. Inst. Oswaldo cruz*, v. 85, p. 35-38, 1990.
- WHO- World Health Organization.- SHISTOSOMIASIS. Fact sheet N.º115, Geneva, 2002.

- ZELCK, U. E.; BECKER, W.; BAYNE, C. J. The plasma proteins of *Biomphalaria glabrata* in the presence and absence of *Schistosoma mansoni*. *Dev. Comp. Immunol*, v.19, p. 181-194, 1995.
- ZELCK, U.; BECKER, W. Lectin Binding to cells of *Schistosoma mansoni* Sporocysts and Surrounding *Biomphalaria glabrata* Tissue. *J. Invertebr. Pathol*, v. 55, p. 93-99, 1990.
- ZHANG, S. M.; LÉONARD, P. M.; ADEMA, C. M.; LOKER, E. S. Parasite-responsive IgSF members in the snail *Biomphalaria glabrata*: characterization of novel genes with tandemly arranged IgSF domains and a fibrinogen domain. *Immunogenetics*, v. 53, p. 684-694, 2001.
- ZHANG, S. M.; LOKER, E. S. The FREP gene family in the snail *Biomphalaria glabrata*: additional members, and evidence consistent with alternative splicing and FREP retrosequences. Fibrinogen-related proteins. *Dev Comp Immunol*, v. 27, p. 175-187, 2003.

# **ANEXOS**

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)