

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES

Doutorado em Saúde Pública

MANUEL ALEXANDER AMARISTA SEVILLA

**ECOLOGIA DO GÊNERO *Biomphalaria* E
ESTRUTURA GENÉTICA DAS POPULAÇÕES DE
Schistosoma mansoni DO ESTADO DE
PERNAMBUCO**

RECIFE

2010

MANUEL ALEXANDER AMARISTA SEVILLA

ECOLOGIA DO GÊNERO *Biomphalaria* E ESTRUTURA GENÉTICA DAS
POPULAÇÕES DE *Schistosoma mansoni* DO ESTADO DE PERNAMBUCO

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em
Saúde Pública do Centro de Pesquisa Aggeu
Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para a
obtenção do grau de doutor em ciências.

Área de concentração:
Controle de Endemias e Métodos de
diagnostico de doenças infecciosas e
Parasitarias.

Orientadora:

Dra. CONSTANÇA SIMÕES BARBOSA

Co-orientadores:

Dr. MANOEL RAIMUNDO DA SENA JUNIOR

Dr. OTAVIO PIERI

RECIFE

2010

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

A485e Amarista, Manuel Alexander Sevilla.

Ecologia do gênero *Biomphalaria* e estrutura genética das populações de *Schistosoma mansoni* do Estado de Pernambuco / Manuel Alexander Sevilla Amarista. — Recife: M. A. S. Amarista, 2010.

159 f.: il.

Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2011.

Orientadora: Constança Simões Barbosa; co-orientadores: Manoel Raimundo da Sena Junior e Otavio S. Pieri.

1. *Schistosoma mansoni* - genética. 2. Estudos ecológicos. 3. *Biomphalaria*. I. Barbosa, Constança Simões. II. Sena Junior, Manoel Raimundo da. III. Pieri, Otavio S. IV. Título.

CDU 616.995.122

MANUEL ALEXANDER AMARISTA SEVILLA

**ECOLOGIA DO GÊNERO *Biomphalaria* E ESTRUTURA GENÉTICA DAS
POPULAÇÕES DE *Schistosoma mansoni* DO ESTADO DE PERNAMBUCO**

Aprovado em: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Dra CONSTANÇA SIMÕES BARBOSA

Departamento de Parasitologia do CPqAM/FIOCRUZ

Orientadora

WAYNER VIEIRA SOUZA

Departamento de Saúde Coletiva do CPqAM /Fiocruz

Dra. NILMA CINTRA LEAL

Departamento de Microbiologia - CPqAM /Fiocruz

Dr. THIAGO ALESSANDRO FERREIRA

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dra. MARIA ELISABETH ARAÚJO

Universidade Federal de Pernambuco

Dedico esta tese a minha Família, em especial, a minha mãe Rosa Sevilla de Amarista, a meus filhos Daniela Alexandra Amarista e Samuel Alexander, a minha esposa Cariminel Burgos de Amarista e a meu pai, Jesús Rafael Amarista *in memoriam*, por acreditar em mim, por me apoiar e dar muita força para conquistar este nível acadêmico.

Quero dedicar esta tese também a minha família brasileira, em especial, a meus irmãos Regina Célia Bressam Queiroz de Figueiredo, Henriel Junior Carvalho e Cristine Queiroz de Figueiredo, por acreditar em mim desde o dia em que cheguei ao Brasil, por me apoiar durante todos os dias, pelo amor, pela força, a conquistar deste nível acadêmico é parte de vocês. Que Deus os abençoe.

AGRADECIMENTOS:

Ao Estado Venezuelano através das políticas de formação executadas pelo Governo da República Bolivariana de Venezuela através do Ex-Ministro da Saúde, Dr. Francisco Armada e ao Secretario executivo de Saúde da Região Andina e Ex-diretor do Instituto de Altos Estudios en Salud Pública “Dr. Arnaldo Gabaldon”, Dr. Oscar Feo, quem me selecionaram e daram a oportunidade de estudar.

Ao Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, por proporcionar toda a estrutura física e acadêmica para desenvolver este trabalho.

A Fundación Gran Mariscal de Ayacucho do Ministério de Ciência e Tecnologia de Venezuela, por financiar minha formação através de uma bolsa de estudo internacional.

A minha orientadora Dra. Constança Simões Barbosa, pela coragem em empreender novos desafios, pela confiança brindada ao abrir espaços físicos e acadêmicos, pela transferência de conhecimento e pela paciência.

Ao Dr. Fábio Lopes de Melo, meu grande amigo, pela ajuda dia a dia na execução do trabalho de bancada, pela excelente qualidade humana, pela transferência de conhecimento, pelo respeito e confiança, por acreditar em min.

A meu Co-orientador Dr. Manoel Raimundo da Sena Junior, pelas orientações na área de estatística, pela paciência e dedicação, pela excelente amizade.

Ao Dr. Carlos Gustavo Regis da Silva, pela excelente colaboração recibida, pela transferencia de conhecimento, pelo respeito e confiança no uso dos espaços físicos.

Ao Dr. José Luiz Portugal, meu grande amigo, pelos conselhos, a capacidade critica e a disponibilidade do tempo.

Ao Dr. Djalma Agripino, pela amizade, pela capacidade critica e de sistematizar os problemas, e pela disponibilidade do tempo.

Ao pessoal do laboratório de Esquistossomose do CPqAM, Tabosa B., Silva M. Fátima.,

Alves dos Santos S., Pessoa Costa L. H., Gonçalves J. F., Nascimento R. C., Severino e meus amigo de todos os dias, pela constancia, pelo compromisso, pela humildade e pelo carinho mostrado durante o desenvolvimento do trabalho.

Ao pessoal do bioterio, Giuliana, Pinto A., Soares J. C., Canêdo M. A. Assis M. I. C., Assis N. A. J., Batista M. C., Serafim R. B., pelo apoio no isalamento dos ciclos biológicos de *S. mansoni*.

Ao pessoal do Departamento de Imunologia, Dra. Silvia Monte Negro. Dr. Roberto Werkhauser, Dra. Sheilla Andrade e os técnicos do laboratório, pelo apoio brindado durante o desenvolvimento do trabalho de biologia molecular.

Aos Doutores Jones Alburquerque e Silvana Boca Negra e o Sr. Tony Fernandez, pelo apoi nas atividades de Campo.

Aos estudades de iniciação científica, Ferreira A. S., Melo M., Brasileiro D., Alvez L. e Freitas C., pela dedicação, pelo compromisso, pela amizade.

Ao serviço da biblioteca do CPqAM, Sra. Mácia Jussara Saturnino, pela eficiência e eficácia na resposta.

Ao programa PPSUS, por financiar este trabalho de pesquisa (Projeto N°: 539_221912518 através do).

Aos profesores Dr. Pointier J.P., Dr. Cesari I., Dr. Incani N., Balzán C., Burgos A., Gomez G., e Limogi J., por me proporcionar as ferramentas necessarias para lograr um ótimo desempenho durante minha atuação no doutorado.

Aos Consul Dra. Coromoto Godoy (Consul Genral de Primera de Venezuelaem Pernambuco) e Dr. Edgar González Rio de Janeiro (Consul Genral de Primera de Venezuelaem em Rio de Janeiro), pela força, pelo apoio moral e pela amizade.

POEMA ITACA

Cuando emprendas el viaje hacia Itaca,
ruega que sea largo el camino,
lleno de aventuras y de experiencias.
A los Lestrigones, a los Ciclopes
y al fiero Poseidón, nunca temas.
No encontraras tales seres en el camino
si se mantiene elevado tú pensamiento y es exquisita
la emoción que te toca el espíritu y el cuerpo.
Ni a los Lestrigones, ni a los Ciclopes,
ni al feroz Poseidón has de encontrar,
si no los llevas dentro del corazón,
si no los pone ante ti tú corazón.

Ruega que sea largo el camino.
Que muchas sean las mañanas de verano
en que con que placer, con alegría
entres en puertos antes nunca vistos.
Detente en los mercados fenicios
para comprar finas mercancías,
madreperlas y corales, ámbar y ébano,
y voluptuosos perfumes de todo tipo,
tantos perfumes voluptuosos como puedas.
Ve a muchas ciudades egipcias
para que aprendas y aprendas de los sabios.

Siempre en la mente has de tener a Itaca.
Llegar allí es tu destino.
Pero no apresures el viaje.
Es mejor que dure muchos años
y que ya viejo llegues a la isla,
rico de todo lo que hayas ganado en el camino,
sin esperar que Itaca te de riquezas.

Itaca te ha dado el bello viaje.
Sin ella no habrías emprendido el camino.
No tiene otras cosas que darte ya.

Y si la encuentras pobre, Itaca no te ha engañado.
Sabio como te has vuelto, con tantas experiencias,
habrás comprendido lo que significan las Itacas.

CONSTANTINE CAVAFY

AMARISTA, Manuel Alexander Sevilla. **Ecologia do gênero *Biomphalaria* e estrutura genética das populações de *Schistosoma mansoni* do Estado de Pernambuco**. 2010. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2010.

RESUMO

A esquistossomose é uma doença crônica que está vinculada particularmente às condições hidro-biológica dos criadouros dos caramujos. Em Pernambuco, nada se sabe sobre a situação atual da ecologia do *Biomphalaria* e da variabilidade genética de *S. mansoni*. Além disso, das implicações desses aspectos na definição da dinâmica de transmissão. O objetivo desta pesquisa foi: Analisar alguns aspectos da ecologia do *Biomphalaria* e da estrutura dos perfis genéticos de *Schistosoma mansoni*. Realizamos um estudo ecológico na escala regional e um estudo experimental na escala local (município de Goiana). Coletamos os moluscos em 14 municípios, tomamos nota das variáveis bióticas (espécies de moluscos e tipo de vegetação aquática) e abióticas (tipo de habitat e tipo de substrato). Analisamos os dados através da Análise de Correlação Canônica (ACC). O diagnóstico da positividade do *Biomphalaria* foi feito através da técnica convencional e a Nested-PCR. Em Goiana, foram isoladas as cepas de *S. mansoni* e de *Biomphalaria*. Também, coletamos caramujos. Por último, isolamos os ciclos de *S. mansoni* dos casos para identificar os perfis genéticos de *S. mansoni* através do RAPD-PCR. Usamos o *Median Joining Network*, para compreender a biogeografia evolutiva do parasito e a dinâmica de transmissão. Os ACC mostraram: 1) *B. stramiena* tem preferência por *Nasturtium spp.* e gramíneas, habitat semi- permanentes, e os substratos argila, areia e pedra, e *B. glabrata*, por *N. lotus*, *E. crassipes* e *P. estratioste*, habitat temporais e o substrato barro; e 2) O gênero *Biomphalaria* esta separado tanto do ponto de vista geográfico como ecológico. As técnicas de diagnósticos mostraram que as duas espécies de *Biomphalaria* são responsáveis pelos focos do litoral. As interações parasito - molusco mais eficiente em Goiana é alopátrica. Identificamos uma variabilidade genética importante através dos *primers* usados. O *MJN* mostrou que a frequência - dependência dos perfis genéticos é direcionada pela pressão de seleção do gênero *Biomphalaria*. Em conclusão o padrão geográfico dos perfis genéticos de *S. mansoni* presentes em Pernambuco depende dos níveis de compatibilidade do *Biomphalaria*. Em acréscimo, a existência de interconexão dos focos do ponto de vista geográfico e funcional explica o caráter focal e heterogêneo da transmissão da esquistossomose neste Estado.

Palavras chave: *Biomphalaria* - *S. mansoni* - Genética - Ecologia - *Median Joining Networks*

AMARISTA, Manuel Alexander Sevilla. **Ecology of genus *Biomphalaria* and genetic structure of *Schistosoma mansoni* populations in the State of Pernambuco**. 2010. Thesis (Doctorate in Public Health) - Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2010.

ABSTRACT

The schistosomiasis is a chronic parasite, but the transmission is determinate by specific conditions of habitats of host intermediate. In Pernambuco, there is not information about the actual situation of ecological of *Biomphalaria* and genetic variability of *Schistosoma mansoni*. Besides, of the implications of those aspects in the definition of the transmission dynamics. The general objective was: To analyze some aspects of the ecology of *Biomphalaria* and of the structure of the genetic profiles of *S. mansoni*. We did an ecological study in the regional scale and an experimental study in the local scale (Goiana). We collected the snails in 14 municipalities, we took note of the variables biotic (species of snails and aquatic vegetation) and biotic (habitats and substratum). We analyzed the data through the Analysis of Canonical Correlation (ACC). The diagnostic of *Biomphalaria* it was done through the conventional technique and Nested-PCR. In Goiana, they were isolated the strains of *S. mansoni* and *Biomphalaria*. Also, we collected snails. Last, we isolated the cycles of *S. mansoni* of the cases to identify the genetic profiles through RAPD-PCR. We used Median Joining Network, to understand the evolutionary biogeography of parasite and the transmission. The ACC showed: 1) *B. straminea* has preference for *Nasturtium* spp. and gramíneas, habitat semi-permants, and the substrats: clay, sands and stone. But, *B. glabrata*, has preference for *N. lotus*, *E. crassipes* and *P. estratioste*, habitats storms and mud; And 2) *Biomphalaria* is separated so much of the geographical point of view as ecological. The diagnostic showed that the two species of *Biomphalaria* are responsible for the focuses of the Pernambuco coast. The interactions between parasite - snail more efficient in Goiana, is alopátrica. We identified an important genetic variability through the primers used. MJN showed that the frequency - dependence of the genetic profiles is addressed by the pressure of selection of the genus *Biomphalaria*. In conclusion, the geographical structure of the genetic profiles of *S. mansoni* present in Pernambuco depends on the levels of compatibility of *Biomphalaria*. In addition, the existence of interconnection of the focuses of the geographical and functional point of view explains the focal and heterogeneous character of the transmission.

Keywords: *Biomphalaria* - *S. mansoni* - Genetic - Ecologia - Median Joining Networks.

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Pluviometria, taxas de infecção natural e abundância relativa dos *Biomphalaria glabrata* coletados na localidade de Carne de Vaca, município Goiana-PE, 2008 - 2009.....62
- Gráfico 2 - Temperatura, taxas de infecção natural e abundância relativa dos *B. glabrata* coletados na localidade de Carne de Vaca, município Goiana-PE, 2008 - 2009.....62
- Gráfico 3 - Pluviometria, taxas de infecção natural e abundância relativa dos *B. straminea* coletados na localidade de Ponta de Pedras, município Goiana-PE, 2008 - 2009.....63
- Gráfico 4 - Temperatura, taxas de infecção natural e abundância relativa dos *B. straminea* coletados na localidade de Ponta de Pedras, município Goiana-PE, 2008 - 2009.....63
- Gráfico 5 - Pluviometria, taxas de infecção natural e abundância relativa dos *B. glabrata* coletados na localidade de Impoeira, município Goiana-PE, 2008 - 2009.....64
- Gráfico 6 - Temperatura, taxas de infecção natural e abundância relativa dos *B. glabrata* coletados na localidade de Impoeira, município Goiana-PE, 2008 - 2009.....65

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ciclo de vida do <i>Schistosoma mansoni</i>	29
Figura 2 - Esquema da construção da análise de correlação canônica.....	43
Figura 3 - Distribuição geográfica das espécies de moluscos de importância médica.....	38
Figura 4 - Correlação entre abundância relativa das espécies de moluscos e as variáveis bióticas.....	49
Figura 5 - Correlação entre abundância relativa das espécies de moluscos e as variáveis abióticas.....	49
Figura 6 - Análise da relação entre as variáveis cepas de <i>S. mansoni</i> (Carne de Vaca: SmCV e Impoeira: SmIpû) e doses de miracidios (1m e 5m), sobre a sobrevivência de <i>Biomphalaria</i> (Carne de Vaca: BgCV, Impoeira: BgIpû, e Ponta de Pedras: BsPP) parasitados.....	71
Figura 7 - Análise da relação entre as variáveis cepas de <i>S. mansoni</i> (Carne de Vaca: SmCV e Impoeira: SmIpû) e doses de miracidios (1m e 5m), sobre a mortalidade de <i>Biomphalaria</i> (Carne de Vaca: BgCV, Impoeira: BgIpû, e Ponta de Pedras: BsPP) que não eliminaram cercárias.....	71
Figura 8 - Median vector X of binary sequences U, V, and W.....	85
Figura 9 - UPGMA Dendograma de Nei's (1978) distância genética entre as populações de <i>S. mansoni</i> em nove municípios do Estado de Pernambuco.....	89
Figura 10 - UPGMA Dendograma da distância geográfica (em Km) entre as populações de <i>S. mansoni</i> em nove municípios do Estado de Pernambuco.....	90
Figura 11 - Correlação entre a distância genética e geográfica das populações de <i>S. mansoni</i> dos nove municípios do Estado de Pernambuco.....	90
Figura 12 - UPGMA Dendograma de Nei's (1978) mostrando a distância genética entre as quatro populações de <i>S. mansoni</i> presentes no município de Goiana, Estado de Pernambuco.....	92
Figura 13 - UPGMA Dendograma da distância geográfica (em Km) nas quatro populações de <i>S. mansoni</i> presentes no município de Goiana, Estado de Pernambuco.....	92
Figura 14 - Distribuição geográfica dos 26 perfis genéticos identificados pelo primer OP-A9 das populações de <i>S. mansoni</i> em nove municípios do Estado de Pernambuco.....	93

Figura 15 - Distribuição geográfica dos 17 perfis genéticos identificados pelo primer OP-A9 das populações de <i>S. mansoni</i> em nove municípios do Estado de Pernambuco.....	94
Figura 16 - Distribuição geográfica dos 22 perfis genéticos identificados pelo primer OP-B6 das populações de <i>S. mansoni</i> em nove municípios do Estado de Pernambuco.....	94
Figura 17 - Distribuição geográfica dos 17 perfis genéticos identificados pelo primer OP-B6 das populações de <i>S. mansoni</i> em quatro localidades do município de Goiana, Estado de Pernambuco.....	95
Figura 18 - Distribuição geográfica dos 16 perfis genéticos identificados pelo primer OP-G13 das populações de <i>S. mansoni</i> em nove municípios do Estado de Pernambuco.....	96
Figura 19 - Distribuição geográfica dos 13 perfis genéticos identificados pelo primer OP-G13 das populações de <i>S. mansoni</i> em quatro localidades do município de Goiana, Pernambuco.....	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Infecção natural determinada através da técnica convencional nos <i>B. glabrata</i> e <i>B. straminea</i> de dez municípios do Estado de Pernambuco, coletados no ano 2008.....	50
Tabela 2 - Avaliação do efeito de várias doses de miracídios de <i>S. mansoni</i> (“BH”) sobre <i>B. glabrata</i> (Pontezinha-PE), durante dois intervalos de tempo (23 - 30 dias e pós-infecção).....	67
Tabela 3 - Avaliação do efeito de várias doses de miracídios de <i>S. mansoni</i> (cepa: “BH”) sobre <i>B. straminea</i> (cepa: Forte Orange, Itamaracá-PE), durante dois intervalos de tempo (27 - 40 dias e pós-infecção).....	68
Tabela 4 - Avaliação do efeito de duas doses de miracídios (1m e 5m) das duas cepas de <i>S. mansoni</i> (Carne de Vaca e Impoeira) sobre as cepas <i>Biomphalaria</i> presentes no município Goiana-PE.....	69
Tabela 5 - <i>Primers</i> usados na amplificação do DNA genômico das populações de <i>S. mansoni</i> selecionadas em municípios do Estado de Pernambuco.....	87
Tabela 6 - Variabilidade genética dos loci RAPD-PCR em nove populações de <i>S. mansoni</i> do Estado de Pernambuco.....	88
Tabela 7 - Distância genética (cor cinza) e distância geográfica das populações de <i>S. mansoni</i> dos nove municípios selecionados no Estado de Pernambuco.....	88
Tabela 8 - Variabilidade genética dos loci RAPD-PCR das quatro populações de <i>S. mansoni</i> presentes no município de Goiana, Estado de Pernambuco.....	91
Tabela 9 - Distância genética (cor cinza) e distância geográfica das quatro populações de <i>S. mansoni</i> presentes no município de Goiana, Estado de Pernambuco.....	91
Quadro 1 - Infecção natural determinada através da técnica Nested-PCR nos <i>B. glabrata</i> e <i>B. straminea</i> de oito municípios do Estado de Pernambuco, coletados no ano 2008.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

mRNA - RNA mensageiro.

cDNA - DNA complementar (fita de DNA complementar a um mRNA).

dATP- desoxiadenosina 5'-trifosfato; dATP é requerido para síntese de ácidos nucleicos, como também são, analogamente, dCTP, dGTP, dTTP e dUTP.

AP-PCR - Reação em cadeia da polimerase com iniciadores arbitrários - “Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction”

ddNTPs - Dideoxynucleotídeos Tri Fosfato

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

dNTP - Desoxirribonucleotídeos Tri Fosfato

EST - Etiqueta de Sequência Expressa – “Expressed Sequence Tag”

EDTA - Ácido Etilenodiaminotetracético

HCl - Ácido Clorídrico

Kb - Kilobases, 10³ pares de bases

KCl - Cloreto de Potássio

M - Molar

mA - Mili-Amperagem

Mb Megabases, 10⁶ pares de bases

MgCl₂ - Cloreto de Magnésio

MJN- Median Joining Network

mRNA - RNA mensageiro

mtDNA - DNA mitocondrial

µg Microgramas, 10⁻⁶ gramas

µl Microlitros, 10⁻⁶ litros

µM Micromolar, 10⁻⁶ Molar

ng - Nanogramas, 10⁻⁹ gramas

pb - Pares de base

PCR - Reação em cadeia da polimerase – “Polymerase Chain Reaction”.

pH - Potencial Hidrogeniônico

pmol - Picomoles, 10^{-12} moles

rRNA - RNA ribossomal

RFLP - Polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição - “Restriction Fragment Length Polymorphism”.

RNA - Ácido Ribonucléico

SNPs - Polimorfismos de Base Única – “Single Nucleotide Polymorphisms”

Taq - *Thermus aquaticus*

TBE - Tris Borato EDTA

TE - Tris EDTA

Tris - Tri-Hidroximetil Amino Metano

U - Unidade

G - Guanina.

C - Citocina.

Cl - Cloreto.

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético.

Kb - Kilobases, unidade correspondente a mil pares de bases.

mM - milimolar

MEGA – Molecular Evolutionary Genetic Analysis.

RAPD - Random Amplified Polymorphic.

G_{st} - Índice de fixação Nei (1977).

H_s - Variabilidade genética existente entre as subpopulações.

H_T - Variabilidade genética existente em relação a população.

N_m - Taxa de migração efetiva.

na – Número de alelos observados.

ne – Número efectivo de alelos.

h – Nei's (1973) diversidade genética.

P – Número de locis polimórficos.

D – Distância genética.

Fst – Índice de fixação Wright (1951).

St. Dev. – Desvio Padrão.

UV – Ultra-violeta.

ml - mililitros.

μl - microlitros.

μg - microgramas.

rpm - revolução por minuto.

WHO - World Health Organization.

opg - Ovos por grama de fezes

Km - Quilometros.

h – Hora.

min. – minuto

nm – nanometros.

Sec. – secundo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
2 LITERATURA	26
2.1 Dispersão da esquistossomose no Brasil e em Pernambuco.....	26
2.2 <i>Schistosoma mansoni</i> Sambon, 1907: biologia e ciclo de vida.....	27
2.3 Interação <i>S. mansoni</i> - <i>Biomphalaria</i>	30
2.4 Genôma do <i>S. mansoni</i>	33
2.5 Estudo da variabilidade genética do <i>S. mansoni</i>	33
2.6 Significado evolutivo da variabilidade genética das populações dos parasitos e sua implicação na epidemiologia.....	35
3 ARTIGO - ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DOS FATORES BIÓTICOS E ABIÓTICOS SOBRE A DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DO GÊNERO BIOMPHALARIA NO ESTADO DE PERNAMBUCO	38
3.1 Introdução.....	38
3.2 Objetivos.....	40
3.2.1 Objetivo geral.....	40
3.2.2 Objetivos específicos.....	40
3.3 Metodologia.....	40
3.3.1 Desenho do estudo.....	40
3.3.2 Distribuição geográfica dos moluscos do gênero <i>Biomphalaria</i>	41
3.3.2.1 Área de estudo.....	41
3.3.2.2 Coleta dos moluscos.....	41
3.3.2.4 Fatores bióticos e abióticos.....	42
3.3.2.5 Análise dos dados pelo teste de Correlação Canônica (ACC).....	42
3.3.3 Taxa de infecção natural dos hospedeiros intermediários pela técnica convencional e Nested-PCR.....	44
3.3.3.1 Positividade dos hospedeiros intermediários.....	44
3.3.3.2 Método convencional.....	44

3.3.3.3 <i>Abordagem molecular</i>	44
3.3.3.3.1 <u>Extração do DNA dos moluscos coletados no campo</u>	45
3.3.3.3.2 <u>Descrição da técnica Nested-PCR</u>	45
3.4 Resultados	46
3.4.1 Distribuição geográfica do gênero <i>Biomphalaria</i> nos municípios selecionados.....	46
3.4.2 Influência dos fatores bióticos e abióticos sobre a distribuição geográfica do gênero <i>Biomphalaria</i> nos municípios selecionados.....	47
3.4.3 Taxas de infecção natural dos hospedeiros intermediários determinadas pela técnica tradicional e Nested-PCR	50
3.5 Discussão	52
3.5.1 Distribuição geográfica dos moluscos do gênero <i>Biomphalaria</i> no Estado de Pernambuco.....	52
3.5.2 Influências dos fatores bióticos e abióticos sobre a distribuição de <i>B. glabrata</i> e <i>B. straminea</i>	53
4 ARTIGO - INTERAÇÕES DAS CEPAS DE <i>Schistosoma mansoni</i> - <i>Biomphalaria</i> PRESENTES NO MUNICÍPIO DE GOIANA-ESTADO DE PERNAMBUCO	55
4.1 Introdução	55
4.2 Objetivos	56
4.2.1 Objetivo geral.....	56
4.2.2 Objetivos específicos.....	56
4.3 Metodologia	56
4.3.1 Desenho do estudo.....	56
4.3.2 Dinâmica natural da abundância relativa e taxas de infecção das populações do <i>Biomphalaria</i> , presentes nas localidades de Carne de Vaca, Ponta de Pedra, e Impoeira, do município de Goiana-PE	57
4.3.3 Avaliação dos níveis de susceptibilidade das interações <i>S. mansoni</i> - <i>Biomphalaria</i> em condições de laboratório, com as cepas de <i>S. mansoni</i> presentes nas três localidades selecionadas no município de Goiana.....	58
4.3.3.1 <i>Isolamento das cepas de moluscos (B. glabrata e B. straminea)</i>	58
4.3.3.2 <i>Isolamento das cepas de S. mansoni</i>	58

4.3.3.3	<i>Definição da dosagem ideal de miracídios para infecção dos moluscos</i>	59
4.3.3.4	Susceptibilidade das cepas de <i>S. mansoni</i> - <i>Biomphalaria</i> (município de Goiana).....	60
4.3.3.5	Análise dos dados para a construção do modelo experimental: <i>S. mansoni</i> - <i>Biomphalaria</i>	60
4.3.3.5.1	<u>Modelo Linear Geralizado Univariado (MLGU)</u>	60
4.4	Resultados	61
4.4.1	Dinâmica da abundância relativa e taxas de infecção das populações do nas três localidades selecionadas no município de Goiana.....	61
4.4.1.1	<i>Localidades litorâneas</i>	61
4.4.1.2	<i>Localidade rural</i>	64
4.4.2	Avaliação dos níveis de susceptibilidade das interações <i>S. mansoni</i> - <i>Biomphalaria</i> , em condições de laboratório.....	66
4.4.2.1	<i>Definição do protocolo das infecções experimentais usando as combinações das cepas de referência (Biomphalaria – S. mansoni)</i>	66
4.4.2.1.1	<u>Combinação das cepas de referências, <i>B. glabrata</i> (Pontezinha-PE) - <i>S. mansoni</i> (BH)</u>	66
4.4.2.1.2	<u>Combinação <i>B. straminea</i> (Forte Orange, Itamaracá-PE) - <i>S. mansoni</i> (BH)</u>	66
4.4.2.2	<i>Análise do modelo experimental (interação de combinações entre cepas Biomphalaria - S. mansoni isoladas a partir das três localidades selecionadas no município de Goiana, Pernambuco)</i>	69
4.5	Discussão	72
5	ARTIGO - ANALISES DA ESTRUTURA DOS PERFIS GENÉTICA DAS POPULAÇÕES DE <i>Schistosoma mansoni</i> PRESENTES NO ESTADO DE PERNAMBUCO	74
5.1	Introdução	74
5.2	Objetivos	77
5.2.1	Objetivo geral.....	77
5.2.1	Objetivos específicos.....	77
5.3	Metodologia	77

5.3.1 Desenho do estudo.....	77
5.3.2 Identificação do polimorfismo genético.....	78
5.3.2.1 Isolamento das sub-populações de <i>S. mansoni</i>	78
5.3.2.2 Coleta dos vermes adultos.....	79
5.3.2.3 Extração do DNA genômico de <i>S. mansoni</i>	79
5.3.2.4 Quantificação e diluição do DNA.....	80
5.3.2.5 Reações RAPD-PCR e eletroforeses.....	80
5.3.2.6 Iniciadores aleatórios (Primers).....	81
5.3.3 Análise da estrutura genética das populações de <i>S. mansoni</i> presentes nos municípios selecionados	81
5.3.4 Análise da distribuição geográfica dos perfis genéticos das populações de <i>S. mansoni</i> nos municípios selecionados através do modelo <i>Median Joining Network</i>	84
5.4 Resultados	86
5.4.1 Identificações do polimorfismo genéticos das populações de <i>S. mansoni</i> presentes nos municípios selecionados.....	86
5.4.2 Análise da estrutura genética das populações de <i>S. mansoni</i> presentes nos municípios selecionados	87
5.4.3 Análise da distribuição geográfica dos perfis genéticos identificados nas populações de <i>S. mansoni</i> através do RAPD-PCR, nos municípios selecionados para o estudo (escala regional e local).....	93
5.5 Discussão	97
5.5.1 Identificações do polimorfismo genéticos das populações de <i>S. mansoni</i> presentes nos municípios selecionados.....	97
5.5.2 Análise da estrutura genética das populações de <i>S. mansoni</i> presentes nos municípios selecionados.....	98
5.5.3 Análises da distribuição geográfica dos perfis genéticos das populações de <i>S. mansoni</i> nos municípios selecionados	100
6 CONCLUSÕES	103
REFERÊNCIAS	106

APÊNDICES	127
Apêndice A - Saída das análises de correlação canônica sobre os fatores abióticos.....	128
Apêndice B - Saída das análises de correlação canônica sobre os fatores bióticos.....	128
Apêndice C - Distribuição da abundância relativa dos <i>Biomphalaria glabrata</i> e da positividade por <i>Schistosoma mansoni</i> , na localidade de Carne de Vaca, municípios Goiana-PE, período 2008-2009.....	129
Apêndice D - Distribuição da abundância relativa dos <i>Biomphalaria glabrata</i> e da positividade por <i>Schistosoma mansoni</i> , na localidade de Impôeira, municípios Goiana-PE, período 2008-2009.....	130
Apêndice E - Distribuição da abundância relativa dos <i>Biomphalaria straminea</i> e da positividade por <i>Schistosoma mansoni</i> , na localidade de Ponta de Pedra, municípios Goiana-PE, período 2008-2009.....	131
Apêndice F - Número de vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> analisados e a localização geográfica dos 9 municípios do Estado de Pernambuco selecionados para os estudo de genética de populações na escala regional.....	132
Apêndice G - Número de vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> analisados e a localização geográfica das 4 localidades do municípios de Goiana-PE selecionados para os estudo de genética de populações na escala local.....	132
Apêndice H - Identificação da variabilidade genética das 9 populações de <i>Schistosoma mansoni</i> selecionada dos municípios do Estado de Pernambuco com ajuda dos primers OP-A9, OP-B6 e OP-G13.....	133
Apêndice I - Identificação da variabilidade genética das 4 populações de <i>Schistosoma mansoni</i> selecionada no município de Goiana-PE com ajuda dos primers OP-A9, OP-B6 e OP-G13.....	135
Apêndice Ja - Padronização RAPD-PCR através do uso de diferentes termocicladores.....	136
Apêndice Jb - Reprodutividade dos Perfis genéticos identificados com ajuda do primers selecionados OP-B06 nas populações de <i>Schistosoma mansoni</i> analisadas do Estado de Pernambuco.....	137
Apêndice K - Perfis genéticos identificados com ajuda do primer A09 nas 9 populações de <i>Schistosoma mansoni</i> analisadas do Estado de Pernambuco.....	137
Apêndice L - Perfis genéticos identificados com ajuda do primer A10 nas 9 populações de <i>Schistosoma mansoni</i> analisadas do Estado de Pernambuco.....	139
Apêndice M - Perfis genéticos identificados com ajuda do primer A13 nas 9 populações de <i>Schistosoma mansoni</i> analisadas do Estado de Pernambuco.....	139

Apêndice N - Perfis genéticos identificados com ajuda do primer B06 nas 9 populações de <i>Schistosoma mansoni</i> analisadas do Estado de Pernambuco.....	140
Apêndice O - Perfis genéticos identificados com ajuda do primer G13 nas 9 populações de <i>Schistosoma mansoni</i> analisadas do Estado de Pernambuco.....	141
ANEXOS.....	142
Anexo A - CURRENT EPIDEMIOLOGICAL STATUS OF SCHISTOSOMIASIS IN THE STATE OF PERNAMBUCO, BRAZIL.....	144
Anexo B - CONTROLE INTEGRADO DO MOLUSCO VETOR.....	150

1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma doença parasitária causada por um trematoda do gênero *Schistosoma*. Em Pernambuco 15,2% da população apresenta-se infectada por *S. mansoni* (KATZ; PEIXOTO, 2000) e segundo Favre (1999, p. 1): “A área endêmica está situada entre os meridianos 35°00’ e 36°02’ de longitude a Oeste de Greenwich e os paralelos de 7°25’ e 8°53’ de latitude Sul”. Trata-se de uma parasitose historicamente endêmica na Zona da Mata e Agreste, estando distribuída em 72 dos 185 municípios do Estado (BARBOSA et al., 2001; FARIAS et al., 2007; FAVRE et al., 2001). Quanto aos vetores incriminados na transmissão, são duas as espécies, *Biomphalaria glabrata* e *B. straminea*. Estes moluscos apresentam diferenças em níveis de susceptibilidade e a distribuição geográfica (FAVRE et al., 2001). Além disso, historicamente, os trabalhos realizados sobre a transmissão da esquistossomose em Pernambuco apontam que as variações observadas sobre prevalência, intensidade da infecção e a epidemiologia clínica depende dos fatores: nutricional, genético, sócio-culturais e condições ecológicas das áreas endêmicas (BARBOSA et al., 2001, 2006. COUTINHO et al., 1997). Mas, nada se sabe sobre a situação atual da ecologia do *Biomphalaria*, sobre a distribuição geográfica da variabilidade genética das populações dos *S. mansoni*, no Estado de Pernambuco e, da implicação desses aspectos na definição da dinâmica de transmissão desta doença.

Quanto à ecologia do *Biomphalaria*, o último estudo reportado na literatura sobre este assunto foi feito há uma década (SILVA et al., 2000). Em acréscimo, com o desenvolvimento econômico e turístico das áreas litorâneas do Estado, e as migrações das populações humanas das áreas rurais para as periferias das cidades em procura de trabalho, tem impactado negativamente os ecossistemas. Em consequência isto ocasionou uma expansão da área endêmica devido à criação de novos focos de transmissão da esquistossomose (BARBOSA et al., 2010). A maior preocupação tem haver com o fato de que *B. glabrata* é uma espécie que tem plasticidade ecológica, portanto, ela pode colonizar qualquer ambiente (AMARISTA et al., 2001). No caso de *B. straminea*, esta espécie já mostrou em condições de laboratório e em algumas experiências de campo semi-controlada, o potencial invasor para colonizar novas áreas geográficas (BARBOSA, 1973; BARBOSA et al., 1981; 1984).

Por outro lado, as pesquisas reportadas na literatura sobre a distribuição geográfica do *Schistosoma* e, a co-evolução e compatibilidade do sistema *Schistosoma-Biomphalaria*, têm mostrado que existe uma relação fechada entre a distribuição geográfica do *S. mansoni* e, o

grau de agregação e os níveis de susceptibilidade das populações de *Biomphalaria* (BLOUIN et al., 1995; CURTIS et al., 2002; STEINAUER et al., 2009; THERON; POINTIER, 1995) Mas, para a compreensão da estrutura geográfica da variabilidade genética do parasita e da dinâmica de transmissão, é necessário considerar outros fatores, como por exemplo, o grau de dispersão dos hospedeiros definitivos e as condições ecológicas e sócio-econômicas de cada foco (BLOUIN et al., 1995; CURTIS et al., 2002; SIRE et al., 1999). Também, estes fatores têm um papel determinante no desenvolvimento e na manutenção da dinâmica da transmissão.

Esta pesquisa esta estruturada em três capítulos e em duas escalas geográficas, regional (Estado de Pernambuco) e local (município de Goiana). Assim, no primeiro capítulo, analisou-se a influência dos fatores bióticos e abióticos sobre a distribuição geográfica dos *Biomphalaria* no Estado de Pernambuco. Para tal fim, foi construído uma Análise de Correlação Canônica. Este modelo estatístico permitiu explicar a separação geográfica como alguns aspectos da ecologia do *Biomphalaria*. Com relação ao segundo capítulo, analisou-se na escala local (município Goiana) a interação parasita-moluscos em condições de laboratório e de campo. Nesta parte, analisamos os conceitos de susceptibilidade e de virulência através da ajuda do Modelo Linear Univariado Generalizado. Esta metodologia elevou o nível de compreensão da transmissão da doença. Quanto ao terceiro capítulo, identificou-se a diversidade dos perfis genéticos das populações de *S. mansoni* dos municípios selecionados no Estado de Pernambuco, com ajuda da técnica Random Amplified Polimorfic DNA-PCR (RAPD-PCR). Além disso, analisou-se a estrutura dos perfis genéticos de *S. mansoni* com ajuda do algoritmo *Median Joining Network*, para explicar a biogeografia evolutiva do parasito e compreender a dinâmica de transmissão tanto na escala regional (Estado de Pernambuco), como na escala local (município de Goiana).

Por último, o desenvolvimento dos três capítulos permitiu examinar a hipótese: “A heterogenidade da dinâmica de transmissão da esquistossomose na escala local depende da conectividade geográfica e funcional dos focos, explica o padrão geográfico da estrutura genética das populações de *S. mansoni* e define o caráter focal da esquistossomose”.

2 LITERATURA

2.1 Dispersões da esquistossomose no Brasil e em Pernambuco

A esquistossomose encontra-se presente em mais de 76 países onde mais de 200 milhões de pessoas encontram-se infectadas, e 500 a 700 milhões estão expostas ao risco (ENGELS et al., 2002; STRICKLAND, 2000). Esta parasitose apresenta duas formas clínicas de referência: a) urinária, causada por *S. haematobium* em 52 países da África e na Região do Mediterrâneo Oriental e b) intestinal causada por *S. japonicum*, em Regiões da Ásia Sul-Oriental e do Pacífico Ocidental e por *S. mansoni* em 53 países, situados na África, Região do Mediterrâneo Oriental, Ilhas do Caribe e na América do Sul (CHITSULO et al., 2000; STRICKLAND, 2000; UTZINGER et al., 2003; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2001).

No Brasil, a introdução da esquistossomose mansônica aconteceu através do tráfico de escravos originários da Costa da Guiné, Angola, Congo e Moçambique, que se estabeleceram inicialmente nas áreas de produção canavieira do Nordeste (CHIEFFI; WALDMAN, 1988). Posteriormente, com a abolição da escravatura e com a inauguração dos grandes ciclos da economia brasileira (ouro, algodão, café), ocorreu migração interna e a dispersão desta doença para novas áreas: inicialmente, Pernambuco e Bahia, expandindo-se posteriormente para todo o Nordeste, Sudeste, Pará, Paraná e, mais recentemente, Santa Catarina, Goiás e Distrito Federal, onde foram registrados casos autóctones (KATZ, 1999). Este processo de dispersão da doença esteve condicionado à presença dos moluscos hospedeiros susceptíveis (AMARAL; PORTO, 1994; LOUREIRO, 1989).

No Brasil há mais de oito milhões de pessoas parasitadas, distribuídas por 19 estados (BARBOSA et al., 2008; COURA; AMARAL, 2004) e 25 milhões estão sob risco de contrair a doença (BURLANDY-SOARES et al., 2003; PASSOS; AMARAL, 1998; WORLD HEALTH ORGANITATION, 2001). As maiores prevalências estão nas Regiões Orientais do Rio Grande do Norte, Paraíba, e em quase toda a totalidade dos estados de Alagoas e Sergipe, grande parte da Bahia e Minas Gerais, Zona Serrana do Espírito Santo e Pernambuco (Zonas do Litoral e Mata, do Agreste e do Brejo) (CHIEFFI; WALDMAN, 1988; REY, 2003).

No Estado do Pernambuco a área endêmica historicamente conhecida é a zona rural cuja base econômica é a produção canavieira. A taxa de infecção em humanos varia, entre 12% a

82% com quadros clínicos crônicos (BARBOSA et al., 2004), com áreas rurais onde a prevalência está acima de 50% (FAVRE et al., 2001). Durante muitos anos a esquistossomose foi considerada um agravo característico da zona rural (CARVALHO et al., 1998; COUTINHO et al., 1997), no entanto, essa doença vem se expandindo para o litoral e áreas urbanas (ARAÚJO et al., 2007; BARBOSA et al., 1996, 1998, 2000a, 2000b, 2001, 2004, 2008, 2010).

Neste sentido, para Barbosa et al. (1996, 2000a, 2000b, 2001) e Freese de Carvalho et al. (1998), a definição da situação epidemiológica atual é consequência de alguns fatos históricos e sócio-econômicos (exemplo: modo de ocupação do espaço e de produção econômica, etc.), aliados a fatores biológicos. O primeiro registro de casos humanos agudos e autóctones no litoral de Pernambuco foi da Ilha de Itamaracá em 1998 (BARBOSA et al., 2000a, 2000b). Pesquisas que vêm sendo realizadas nesta área mostram: (1) a prevalência e quantidade de ovos por grama de fezes (opg), para os moradores nativos foram 41,8% e 10 opg, indicando pouca exposição, para os trabalhadores da construção civil, registrou-se 45,8% e 100 opg; (2) as pessoas nativas da área trabalhavam como prestadores de serviços para os veranistas e com relação aos trabalhadores da construção civil, 92% procediam da área endêmica (Zona da Mata); (3) o molusco incriminado na transmissão foi *B. glabrata* e a positividade variou entre 7,9% e 18,7% (BARBOSA et al., 2000b).

Outro inquérito parasitológico no ano 2000, em Porto de Galinhas, mostrou o maior surto de esquistossomose ocorrido em localidades litorâneas com 662 casos agudos para *S. mansoni* e média de 152 opg (BARBOSA et al., 2001). Registros sobre a transmissão no litoral apontam focos ativos com prevalências de 18% no município de Goiana, especificamente na Praia Carne de Vaca (PAREDES, 2008).

2.2 *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907: biologia e ciclo de vida

O *Schistosoma mansoni* é um parasito digenético, pertence a Classe Trematódea, Família Schistosomatidae. Esta espécie se caracteriza por não ter faringe, apresenta dimorfismo sexual e na fase adulta possui o corpo achatado dorso-ventralmente. Acredita-se que o dimorfismo sexual esteve acompanhado de alterações fenotípicas. A fêmea possui o tegumento liso, é mais comprida e filiforme, e mede cerca de 1,5 cm. Os estudos realizados por Morand e Müller-Graf (2000) sugerem que as mudanças da morfologia da fêmea foram

determinadas pela necessidade de encontrar um local especializado para a postura dos ovos em local que viabilizasse sua eliminação para o ambiente externo. O macho mede cerca de 1 cm e se caracteriza por ter um tegumento coberto por tubérculos e espinhas e um canal ginecóforo para albergar a fêmea e fecundá-la.

As fêmeas não são capazes de completar a sua maturação sem o acasalamento e alguns estudos sugerem que a fêmea necessita do macho para o processo de transporte, fertilização e estimulação de fatores para o seu crescimento e desenvolvimento (GREVELDING et al., 1997; KUNZ, 2001). Sob o ponto de vista evolutivo, acredita-se que os machos têm um poder de dispersão maior (PRUGNOLLE et al., 2002b, 2003, 2005). Alguns estudos apontam a competência dos machos em garantir as fêmeas dentro do hospedeiro definitivo para favorecer a estrutura da diversidade genética das populações e em consequência evitar problemas de consanguinidade dentro das subpopulações (MOSSMAN; WASER, 1999; PRUGNOLLE; DE MEEUS, 2002a). Hernandez et al. (2004) e Kunz (2001) verificaram a dominância dos machos e sua maior proporção nas infecções naturais do hospedeiro definitivo, acreditando que eles possuem um mecanismo desconhecido que permite regular a expressão de genes na fêmea, influenciando o desenvolvimento somático, o sistema reprodutivo e a fertilidade (LENZI et al., 2008).

O ciclo biológico de *S. mansoni* apresenta uma alternância de gerações das infrapopulações entre o hospedeiro intermediário, moluscos do gênero *Biomphalaria*, e os hospedeiros definitivos vertebrados (homem e mamíferos pequenos). O ciclo biológico de *S. mansoni* poderia iniciar-se a partir da eliminação das fezes dos indivíduos contaminados (letra a, Figura 1) contendo os ovos do parasito (letra b, Figura 1), que, entrando em contato com coleções de água doce com condições ideais de temperatura e umidade, liberam os miracídios (letra c, Figura 1) que são as formas infectantes do hospedeiro invertebrado (letra d, Figura 1). Nos caramujos, cada miracídio se transforma em esporocisto mãe (letra e, Figura 1) que por poliembrião, origina esporocistos primários (letra f, Figura 1) e secundários (letra g, Figura 1). Estes migram para as glândulas digestivas (letra h, Figura 1) e ovoteste do caramujo, originando as cercárias que serão liberadas através do poro dos esporocistos, e conseguirão sair através da pele ou do sistema excretor do molusco. A cercária (letra i, Figura 1) infecta o homem ou outros hospedeiros vertebrados por penetração ativa na pele exposta nos ambientes contaminados pelo parasito. Ao penetrar na pele, as cercárias perdem a cauda, transformando-se em esquistossômulos (letra j, Figura 1). Os esquistossômulos migram para os pulmões cerca de sete dias após a penetração, e posteriormente, para o sistema porta hepático. Após a maturação, aproximadamente 45 dias após a infecção, os vermes adultos se alojam no plexo

mesentérico podendo viver cerca de 20 anos no hospedeiro definitivo (COELHO, 1970). O ciclo se completa com a postura de ovos pela fêmea (Figura 1), aproximadamente 300 ovos por dia (PELLEGRINO; COELHO, 1978; VALADARES et al., 1981) sendo a grande parte dos ovos eliminados junto às fezes. Alguns ovos ficam retidos na mucosa intestinal e nos capilares do sistema porta do hospedeiro, onde desencadeiam uma reação inflamatória granulomatosa. Esta reação ao redor dos ovos é a principal causa da patogenia da esquistossomose, provocando fibrose do tecido ou órgãos. Além disso, há obstrução do plexo venoso, que tem como consequência uma hipertensão portal, hepatomegalia, esplenomegalia, ascite (aumento do volume abdominal) e formação de varizes esofágicas.

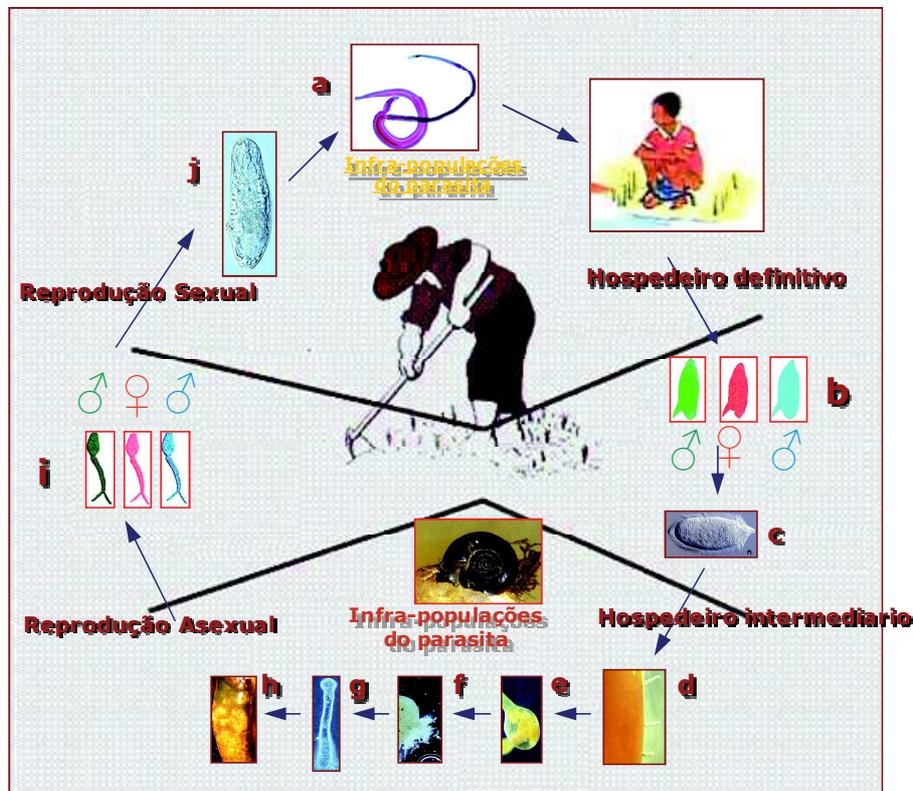


Figura 1. Ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*.

Fonte: Adaptado de Pessoa e Martins (1988).

Nota: Etapas do ciclo biológico: a.- Adultos em cópula; b.- Ovo; c.- Miracídio; d.- Infecção do hospedeiro intermediário; e.- Esporocisto mãe; f.- Esporocistos de primeira geração; g.- Esporocistos de segunda geração; h.- Hepatopâncrea; i.- Cercária; j.- Esquistossômulo.

2.3 Interação *Schistosoma mansoni* - *Biomphalaria*

Para sobreviver, multiplicar-se e completar o ciclo de vida, *S. mansoni* deve ser imunobiologicamente compatível com os hospedeiros e esta associação está definida por um alto nível de especificidade. O molusco que permite o desenvolvimento destas etapas é considerado susceptível para um parasito compatível (FRIED; GRACZYK, 1997). A compatibilidade pode ser definida como a expressão da genética sobre os estados físicos e fisiológicos (incluindo o químico) tanto do parasito quanto do molusco que permitem ao parasito penetrar e se desenvolver com o fim de garantir uma interação duradora no tempo (CHENG, 1968; COMBES, 1995). Em contrapartida, a incompatibilidade do molusco ocorre quando a expressão do componente genético determina o desenvolvimento de fatores físicos e fisiológicos que impedem parcial ou completamente o estabelecimento e o desenvolvimento normal do parasito (CHENG, 1968). Se um miracídio entra no molusco e encontra um ambiente interno fisiológico e/ou bioquímico que não favorece o seu completo desenvolvimento, este hospedeiro é considerado inadequado ou resistente (FRIED; GRACZYK, 1997). Tanto a compatibilidade quanto a incompatibilidade são características importantes na determinação da evolução do parasito dentro dos moluscos. É importante salientar que a associação específica parasito-molusco é modulada por filtros ou fatores biológicos, ecológicos, bioquímicos, imunológicos e genéticos (NEWTON, 1953; ALVAREZ; DELGADO, 1999).

Sabe-se que fatores ecológicos (abióticos e bióticos) como a relação entre a temperatura e a evolução da infecção por *S. mansoni* nos hospedeiros intermediários exercem influência direta na eclosão miracidiana, no encontro entre hospedeiro intermediário-parasito e na emissão das cercárias (ALVAREZ; DELGADO, 1999; BARBOSA; OLIVIER, 1958; FAVRE et al., 1995; CARVALHO et al., 2008; FERNANDEZ; PIERI, 2001; STADEN, 1952). Alguns estudos mostraram que temperaturas baixas (23 a 25°C) retardam o desenvolvimento da infecção dentro do molusco e em conseqüência o número das cercárias eliminadas pelos moluscos é menor (FERNANDEZ; PIERI, 2001). Neste caso, o período prepatente pode ir de 35 a 56 dias (STADEN, 1952). No entanto, temperaturas entre 31 e 33°C podem acelerar o período prepatente obtendo-se a saída de cercárias no 18º dia pós-infecção (BARBOSA, 1959). Além da temperatura, os parâmetros físico-químicos da água como pH, concentração de cálcio, porcentagem do oxigênio dissolvido e condutividade são

importantes na distribuição dos hospedeiros intermediários e suas taxas de infecção (DILLOM, 2000).

Por outro lado, a localização geográfica (simpatria e alopatria) tanto do parasito quanto do caramujo também influenciam a relação parasito-molusco. A relação simpátrica ocorre quando duas populações de espécies diferentes ocupam a mesma área geográfica. Populações da mesma espécie, ou não, que habitem ambientes diferentes e distantes do ponto de vista geográfico, são considerados alopátricas (ARMÊNIO et al., 1991). Neste sentido, Théron et al. (1997) mostrou que nas combinações *B. glabrata* - *S. mansoni* ocorrem diferenças intra-específicas entre combinações geográficas. Nesta mesma ordem de ideias, alguns estudos mostram que a aptidão do parasito é maior quando ele está em seu ambiente simpátrico do que em condições alopátricas devido a pressões seletivas sofridas que resultam na implantação de uma adaptação local (MORAND et al., 1996; WEBSTER et al., 2004).

Com relação aos fatores biológicos, a interação parasito - molusco pode ser influenciada pela idade e tamanho do hospedeiro e pela quantidade de miracídios penetrantes. A influência da idade na combinação *S. mansoni* - *Biomphalaria* ainda não é completamente definida, mas tem sido alvo de estudos (FAVRE et al., 1995; GÉRARD et al., 1993; GÉRARD; THERON, 1995; FERNANDEZ; THIENGO, 2002; THERON, 1981). Niemann e Lewis (1990) afirmam que a susceptibilidade de *B. glabrata* e a produção de cercárias de *S. mansoni* são fortemente influenciadas pelo tamanho do hospedeiro e não por sua idade, uma vez que a capacidade de desenvolvimento de muitos esporocistos primários (que determinam o número dos esporocistos filhos produzidos) diminui com o tamanho do hospedeiro. Gérard et al. (1993) verificaram que, além do tamanho do molusco, a dose miracidial na ocasião da exposição modifica a dinâmica de desenvolvimento da população de esporocistos filhos e interfere na produção de cercárias em virtude do comprometimento de espaço e da energia no hospedeiro. Além disso, a longevidade dos moluscos hospedeiros pode ser alterada com a carga parasitaria devido à severa alteração dos tecidos parasitados (MALEK, 1985). Somam-se a esta situação, os resultados dos estudos de Lancastre et al. (1984), em que os miracídios fêmeas seriam mais virulentos que os machos, porque moluscos parasitados por este sexo têm uma longevidade mais curta.

Quanto aos fatores genéticos, estudos realizados por Paraense e Corrêa (1973), sugerem que a variação na susceptibilidade seria um aspecto da variação intra-específica do molusco e os graus de susceptibilidade dependeriam da frequência relativa dos genótipos resistentes e susceptíveis em cada população. Já Magalhães e Dias (1973) sugeriram que a susceptibilidade dos planorbídeos à infecção pelo *S. mansoni* estaria em dependência do

comportamento do verme e do caramujo que apresentariam variações inter e intra-específicas. Além disso, conforme sugerido por Webster et al. (2004), no binômio molusco - esquistossomo, é aplicável a relação “gene-for-gene”, isto é, para cada gene condicionando a susceptibilidade existe um gene específico condicionando à patogenicidade do parasito. Deste modo, a contra-seleção de qualquer efeito patogênico inútil é um fato muito geral, porque o interesse do parasito é manter a transmissão. Assim, este manterá o efeito patogênico nos casos de aumento da *fitness* permitindo a continuidade da transmissão, apesar de ocasionar a morte do hospedeiro. No sentido contrário, a morte do hospedeiro poderia ocasionar uma redução da *fitness* com redução da patogenicidade para poder dar continuidade ao ciclo biológico (COMBES, 1995). Para o *S. mansoni*, alguns estudos mostram que a patogenicidade do parasito sobre o molusco parece estar associada com as formas clínicas mais graves e com a taxa de reprodução do parasito (WEBSTER; DAVIES, 2001; WEBSTER et al., 2004). Assim, as cepas mais virulentas afetam negativamente a sobrevivência dos hospedeiros e a produção de ovos do parasita é reduzida, porque existe um maior investimento de energia na infectividade e na virulência (WEBSTER; DAVIES, 2001; WEBSTER et al., 2004).

Com relação aos fatores imunológicos na interação parasita - hospedeiro, o sistema interno de defesa dos moluscos é composto pelos componentes celular e humoral e os hemócitos circulantes constituem a principal linha de defesa celular. São células fagocíticas que circulam na hemolinfa e migram para os tecidos conjuntivos podendo encapsular e matar as larvas digenéticas por fagocitose, lançar substâncias citotóxicas, ou ambos (ADEMA; LOKER, 1997). Isto significa que os hemócitos têm um importante papel no controle da compatibilidade das associações parasito-molusco (SAPP; LOKER, 2000). Estes são originados em uma pequena área da zona reno-pericardial do molusco, designada de “órgão formador de amebócito” ou APO (ANDRADE; SOUZA, 2006). Em *B. glabrata* resistentes, o encapsulamento do *S. mansoni* pelos hemócitos e a provável liberação de substâncias citotóxicas para que ocorra a fagocitose, constituem a principal linha de defesa imunológica desenvolvida (MATRICON-GONDRAN; LETOCART, 1999). Mesmo quando o caramujo *B. glabrata* se mostra sensível à infecção natural ou em condições de laboratório, a hemolinfa desse hospedeiro representa um grande fator de defesa contra a invasão da larva do *S. mansoni* (SAPP; LOKER, 2000).

2.4 Genôma do *S. mansoni*

S. mansoni tem oito pares de cromossomos ($2n = 16$), dos quais sete são autossômicos e um sexual (SHORT; MENZEL, 1960; SHORT et al., 1979). Assim, a fêmea é heterogamética (ZW) e o macho homogamético (ZZ) (SHORT; GROSSMAN, 1981). O sexo é determinado no zigoto por um mecanismo de mutação. O tamanho do genoma haplóide é de aproximadamente $2,7 \times 10^8$ pares de base (pb), com um conteúdo de guanina e citosina de 29,2% (MARX et al., 2000). De acordo com Simpson et al. (1982 apud SIMÕES, 2005, p. 7): “O genoma é constituído 4% a 8% de sequências de DNA altamente repetitivas (>1000 cópias), 35% a 40% de sequências de DNA de média repetitividade (~100 cópias) e aproximadamente 60% representam famílias de genes ou regiões de cópia única”. Estima-se que o genoma do *S. mansoni* contenha entre 15.000 e 25.000 genes (LoVERDE et al., 2004).

2.5 Estudos da variabilidade genética do *S. mansoni*

A análise eletroforética de isoenzimas foi a primeira técnica usada para estudar a variabilidade genética (PASTEUR et al., 1987) sendo uma ferramenta fácil a se desenvolver, de custo baixo e com um marcador codominante, porém os níveis de polimorfismo detectados eram geralmente baixos. O primeiro estudo mostrando o uso desta ferramenta foi desenvolvido sobre várias cepas alopátricas (África, Sudeste de Ásia, América do Sul, Índia Oriental) de *S. mansoni* que apresentavam diferentes níveis de infectividade sobre *B. glabrata*. Estudo pioneiro, usou 14 sistemas enzimáticos, observando que 7 dos 18 *loci* estudados mostravam-se polimórficos, embora não tenha sido possível determinar uma clara correlação entre infectividade e polimorfismo isoenzimático (FLETCHER et al., 1981). Doze anos mais tarde Navarro et al. (1992) usaram a mesma técnica para o estudo da variabilidade entre cepas alopátricas (Venezuela e Brasil) e mostraram existir diferenças entre os grupos, mas não em inter-grupos.

No início dos anos da década de 1980 diversas técnicas foram utilizadas para analisar o genoma do *S. mansoni*. Inicialmente, o “Southern blotting” foi usado para estudos da variabilidade genética desta espécie do parasito. Posteriormente, foram usadas sondas de RNA ribossomal (rRNA), hibridizadas ao DNA genômico com enzimas de restrição, para

identificação de espécies e cepas deste parasito. Também foram usados marcadores moleculares detectáveis como polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição (Restriction Fragments Length Polymorphisms - RFLP) com uma sonda de gene ribossomal (McCUTCHAN et al., 1984; DEPRÈS et al., 1993; KAUKAS et al., 1994).

A técnica da “Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)” na década dos 1980, desenvolvida por Mullis e Faloona (1987), tornou-se uma técnica extremamente atrativa nos estudos de variabilidade genética através de estudo do rDNA e mtDNA, porque além de permitir confirmar os achados obtidos por técnicas como eletroforese de isoenzimas ou uso de sondas de rRNA, estava de fato aportando muita informação sobre o genoma da espécie problema (SIMPSON et al., 1984). Entre as primeiras técnicas usadas para identificar marcadores genéticos no início dos anos 90 destaca-se o Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction (AP-PCR) (WELSH; McCLELLAND, 1990). Quase simultaneamente Williams et al. (1990) publicaram a aplicação da mesma técnica com o nome de Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). Não obstante, a metodologia desenvolvida por Welsh e McClelland difere da proposta por Williams et al. (1990) em relação ao tamanho dos iniciadores. Este último usou iniciadores de nove ou dez nucleotídeos com 50% a 80% de G+C.

A técnica RAPD produz marcadores genéticos dominantes e se caracteriza por ser um processo simples, baseado na amplificação do DNA genômico com ajuda de *primer* de sequência de nucleotídeos arbitrária que detecta a variabilidade ou polimorfismos genéticos. Cada *primer* amplifica por PCR vários segmentos de DNA (detectados por eletroforese em gel de agarose corados com brometo de etídeo) e muitos deste mostrarão o polimorfismo existente entre os grupos analisadas (espécies, cepas ou subpopulação). Esta variabilidade se expressa com a presença ou ausência das bandas (produtos amplificados na PCR), isto pode ser interpretado como uma perda da informação ao ser comparado com marcadores genéticos codominantes e polimórficos como o caso dos microssatélites ou o polimorfismo de base única (SNPs). O RAPD gera uma fonte grande de dados, sendo mais informativo sobre a estrutura das populações e sua diversidade genética do que as isoenzimas (CAMPBELL et al., 2000). Em contrapartida, a amplificação dos microssatélites pela PCR é uma excelente ferramenta para estudo da diversidade. Os microssatélites são pequenas sequências de DNA repetidas, contendo de 1 a 6 bases repetidas em *tandem* (OLIVEIRA et al., 2008), amplamente distribuídas nos cromossomos de eucariotos (CHALERSWORTH et al., 1993). Devido ao caráter polimórfico os microssatélites são usados em análises de variabilidade genética, na diferenciação entre indivíduos (HAGELBERG et al., 1992; OLIVEIRA et al., 2008),

estimativa de fluxos gênicos (CURTIS; MINCHELLA, 2000) e em estudos populacionais (SHRIVASTAVA et al., 2005).

Com a existência de projetos para sequenciamentos do *S. mansoni* em larga escala aumentou-se o interesse em descobrir novos tipos de marcadores, a exemplo dos polimorfismos de base única ou SNPs (OLIVEIRA et al., 2008). No caso dos humanos, os SNPs são hoje descritos como o tipo de variação genética mais frequente no genoma e têm recebido atenção especial em estudos genéticos devido à sua abundância e estabilidade, comparado aos microssatélites (GRAY et al., 2000), além de poderem estar diretamente ligados a fenótipos de interesse (GENTILE; OLIVEIRA, 2008).

Por outro lado, quase 20 anos após a descoberta do genoma, os avanços são ainda muito modestos sobre os estudos de expressão gênica e pouco o quantitativo de proteínas com sequências depositadas em bancos de dados. Em acréscimo, o desenvolvimento do número de marcadores polimórficos como Microssatélites e Polimorfismo de Base Única (SNPs) para uso em grande escala genômica, também é insuficiente para permitir uma verificação global do polimorfismo de *S. mansoni*.

2.6 Significados evolutivos da variabilidade genética das populações dos parasitos e sua implicação na epidemiologia da doença

Dentro das populações haploides, a proporção dos indivíduos que apresentam um determinado alelo, permite determinar a frequência deste alelo dentro da população. No caso dos organismos diplóides como o *Schistosoma*, os genes estão pareados dentro dos indivíduos, portanto para se descrever a estrutura genética da população para um determinado locus é necessário considerar tanto a frequência genotípica como a frequência alélica (OLIVEIRA et al., 2008). A frequência genotípica pode ser descrita como frequência de diferentes genótipos no loco considerado e o conjunto desta frequência permitirá determinar a estrutura genotípica da população para este loco. A frequência alélica ou frequência gênica pode ser descrita como frequências dos diferentes alelos para o loco considerado na população (OLIVEIRA et al., 2008). Por meio da determinação destes parâmetros é possível analisar a estrutura genética das populações. Além disso, essa informação é de grande importância para compreender os processos micro e macroevolutivos.

Segundo Queiroz (2002, p. 39), “A variabilidade genética é um atributo das populações naturais, constatada através da existência de duas ou mais formas alélicas na maioria dos locos genéticos investigados”. Na escala local, estas alterações genéticas podem ser mantidas no espaço e no tempo, por processos microevolutivos como os eventos mutacionais (substituições de nucleotídeos, inserções/deleções, conversões gênicas e recombinação interalélica), deriva genética, fluxo genético e seleção natural (HEDRICK, 2000). Também existem outros fatores que podem influenciar a variabilidade genética dentro e entre as populações dos parasitos, como a mobilidade dos hospedeiros, o modo de reprodução dos parasitos, a complexidade do ciclo biológico, o tamanho das infrapopulações, o uso de hospedeiros específicos e os fatores bióticos e abióticos (HUYSE et al., 2005; PRUGNOLLE et al., 2003).

A diferenciação genética das populações dos parasitos pode estar determinada pela existência de um processo de especiação ou por uma incipiente diferenciação genética determinada pelos níveis de compatibilidade nas interações parasito-hospedeiros, sendo o fluxo gênico e a migração, variáveis importantes na definição destes processos. Na definição dos termos “migração” e “fluxo gênico”, a taxa de fluxo gênico pode ser medida pelo número de indivíduos migrantes que se desloca entre diferentes áreas geográficas e que se reproduzem, podendo alterar a distribuição espacial dos genes (PERECIN, 2000). Assim, o fluxo gênico entre populações estabelecidas reduz a diferenciação genética entre elas, sendo um dos mecanismos responsáveis pela introdução de novas variações na população receptora (WRIGHT, 1931). O fluxo gênico pode ser interpretado através de vários modelos genéticos teóricos, como por exemplo: o *Modelo Continente-Ilha*, em que o fluxo de alelos ocorre em uma única direção, partindo de uma população grande para uma população menor e isolada; o *Modelo de Ilhas*, onde o movimento de alelos se dá ao acaso, em qualquer direção, entre um grupo de pequenas populações; o *Modelo Stepping Stone*, onde o fluxo gênico ocorre apenas entre populações vizinhas; e o *Modelo de Isolamento por Distância*, em uma população contínua onde o fluxo de alelos ocorre entre vizinhos próximos (PERECIN, 2000).

As variações geográficas da estrutura genética das populações de *Schistosoma* estão em dependência dos processos coevolutivos determinado pela interação parasito - molusco (DUMONT et al., 2007; MORGAN et al. 2001; 2005; WEBSTER; DAVIES, 2001; WEBSTER et al., 2004). A interpretação dos processos coevolutivos pode ser feita através dos modelos teóricos *Frequência-Dependência* ou “*Red Queen*”, cujas teorias propõem que mesmo que o ambiente físico não mude, as espécies mudam dentro do tempo para responder as mudanças induzidas pelas outras espécies que compõem o ecossistema (COMBES, 1995);

o modelo *Coevolução Denso-Dependente* sugere que a interação parasito-hospedeiro pode alcançar um equilíbrio e mostrar ciclos persistentes, que dependem das condições iniciais. O *Custo-Benefício Trade-Offs* não acontece no modelo de *Frequência-Dependência* ou a *Seleção Denso-Dependente*, já que a coevolução do hospedeiro pode favorecer a fixação de níveis ótimos de resistência, infectividade e virulência, mas isto pode mudar no tempo e no espaço por causa dos câmbios do *Custo-Benefício*. Na *Teoria do Mosaico Geográfico* propõe-se um mosaico entre as populações, que favoreceria o desenvolvimento dos processos coevolutivos em diferentes direções entre e intra populações (WEBSTER et al., 2004; WEBSTER; DAVIES, 2001). É importante salientar que tanto a ordem da explicação dos modelos como sua aplicação não implicam uma hierarquia, nível de importância ou de exclusão entre os modelos, pelo contrário, um modelo poderia se apoiar em outro para complementar a explicação dos processos coevolutivos dos parasitos - hospedeiros.

Dentro do contexto epidemiológico, a compressão do processo de coevolução parasito - molusco tem um papel importante na explicação da manutenção do polimorfismo relacionado com os modos de transmissão, a virulência, infectividade, e resistência aos fármacos por parte dos parasitos (HUYSE et al., 2005; PRUGNOLLE et al., 2003, 2006; WEBSTER et al., 2004; WEBSTER; DAVIES, 2001).

3 ARTIGO - ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DOS FATORES BIÓTICOS E ABIÓTICOS SOBRE A DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DO GÊNERO *Biomphalaria* NO ESTADO DE PERNAMBUCO

3.1 Introdução

A esquistossomose mansônica é uma parasitose que está vinculada particularmente às condições hidro-biológicas dos criadouros dos caramujos hospedeiros intermediários, situação sócio-econômica e epidemiológica das populações humanas das áreas de risco. No Brasil há 11 espécies descritas do gênero *Biomphalaria* (BRASIL, 2008), porém apenas três foram identificadas como vetores naturais de *Schistosoma mansoni*, estas são: *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea* e duas espécies são consideradas hospedeiras intermediárias potenciais, *B. amazonica* e *B. peregrina* (BRASIL, 2008; CALDEIRA et al., 2009). Em Pernambuco há duas espécies de moluscos incriminados na transmissão do *S. mansoni*: *Biomphalaria straminea* e *B. glabrata*. O *B. straminea*, principal vetor em ocorrência e extensão geográfica, está presente no Agreste e na Zona da Mata de Pernambuco exibindo baixas taxas (inferior a 5%) de infecção natural. Apesar disto, a constante exposição das pessoas aos focos mantém altos os níveis de endemicidade da doença (BARBOSA et al., 2010; FAVRE, 1995, 1999; FAVRE et al., 2001; PARAENSE; CORRÊA, 1989). Por outro lado, *B. glabrata* é encontrado principalmente em áreas litorâneas deste Estado, onde é responsável por muitos focos ativos e apresenta taxas de infecção natural em torno de 20% (BARBOSA et al., 2000a). Esta situação sugere uma separação geográfica entre as duas espécies vetoras, no entanto, não está claro, na literatura, quais são os fatores bióticos e abióticos que estão favorecendo a distribuição geográfica destas espécies vetoras, no Estado de Pernambuco.

Em acréscimo, os estudos mais recentes sobre a ecologia do *Biomphalaria* neste Estado foram realizados há cerca de uma década, por Bezerra da Silva et al. (2000). Durante este período têm acontecido mudanças importantes, tanto no modo de produção econômica (desenvolvimento turístico e industrial) como na ocupação do espaço urbano por parte das populações humanas. Isto tem impactado negativamente os ecossistemas. Neste sentido, a importância de estudar os aspectos ecológicos do habitat do *Biomphalaria* como a composição específica da vegetação, os parâmetros físico-químicos da água, condições hidro-

geográficas, tipos de solos e os períodos climáticos, etc., têm como finalidade estabelecer indicadores que permitam explicar a atual distribuição geográfica destes vetores e em consequência a ocorrência da transmissão (AMARISTA et al., 2001; BARBOSA; BARBOSA, 1994; GIOVANELLI et al., 2003; KLOOS et al., 2004). A relação positiva destas variáveis (bióticas e abióticas) com os vetores determina o grau de segregação dos habitats, nichos e sua distribuição geográfica (AMARISTA et al., 2001; GUIMARÃES et al., 2001).

Por outro lado, como já foi indicado acima, as duas espécies de *Biomphalaria* incriminadas na transmissão da esquistossomose do Estado de Pernambuco apresentam diferenças quanto as taxas de infecção natural. Desta forma, o uso da técnica tradicional (exposição direta à luz) e a abordagem molecular [técnica Polymerase Chain Reaction-Nested (Nested -PCR)] como técnica complementar para o diagnóstico da positividade causada por *S. mansoni* sobre estes vetores permitiu identificar os focos ativos. Além disso, a vantagem da implementação da técnica Nested -PCR nos trabalhos de campo, está relacionado com o aumento da sensibilidade do diagnóstico, principalmente nas áreas que apresentam vetores com baixos níveis de compatibilidade ou susceptibilidades e períodos pré-patentes variáveis, como no caso de *B. straminea*. A Nested-PCR, é um sistema que se encontra otimizado no Departamento do Parasitologia/Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães-Fiocruz Pernambuco. Este sistema é muito sensível (94%) e pode detectar entre 0.4 e 4 ng/reação de DNA de *S. mansoni* no *Biomphalaria* exposto (MELO, 2006).

O exposto acima justificou a realização de um estudo de campo no Estado de Pernambuco, com o objeto de analisar a influência dos aspectos ecológicos sobre a distribuição do gênero *Biomphalaria* e as taxas de infecção natural causada por *S. mansoni*. Estes conhecimentos serão imprescindíveis para o planejamento e desenvolvimento das ações de controle do programa de esquistossomose.

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo geral

Analisar alguns aspectos ecológicos e determinar as taxas de infecção natural do gênero *Biomphalaria* no Estado de Pernambuco.

3.2.2 Objetivos específicos

- a) Determinar a taxa de infecção natural dos hospedeiros intermediários pelas técnicas tradicional e Nested-PCR.
- b) Analisar a influência dos fatores bióticos e abióticos sobre a distribuição geográfica do gênero *Biomphalaria* nos municípios selecionados.

3.3 Metodologia

3.3.1 Desenho do estudo

A escolha de vários municípios para fazer as coletas dos moluscos de importância médica uma vez no espaço e no tempo no Estado de Pernambuco permitiu a realização de um estudo ecológico. Neste trabalho a unidade de análise foi à abundância relativa, a qual foi determinada em cada ponto de coleta para cada espécie de molusco.

3.3.2 Distribuição geográfica dos moluscos do gênero *Biomphalaria*

3.3.2.1 Área de estudo

Os critérios de escolha das áreas de estudo foram a endemicidade (taxa de prevalência e de intensidade da infecção) da doença e as facilidades de acesso às localidades. Deste modo, foram selecionados os seguintes municípios: Itamaracá, Goiana, São Lourenço da Mata, Olinda, Paulista, Jaboatão dos Guararapes, Ipojuca, Itaquitinga, Timbaúba, Aliança, Itambé, Chã de Alegria, Cortês, Gameleira (Zona da Mata), e Garanhuns (Agreste). No município de Goiana (escala local), selecionaram-se as seguintes localidades: no litoral (Praia de Carne de Vaca, Praia de Ponta de Pedra) e na área rural (Impoeira).

3.3.2.2 Coleta dos moluscos

Esta atividade foi realizada durante o período de maio de 2007 a maio de 2008. Todos os criadouros e cursos de água selecionados foram avaliados só uma vez. Depois de cada avaliação foi determinada a abundância relativa ou o número de moluscos de cada uma das espécies encontradas por unidade de tempo definida e por ponto de coleta. Cada amostra implicou em uma coleta aleatória sem reposição de todas as espécies de moluscos presentes nesses habitats. Para tal fim utilizou-se uma concha (diâmetros: abertura 20 cm, profundidade 15 cm, fundo 15 cm) perfurada para facilitar a saída da água. O tempo da coleta foi de 30 min. em cada ponto, pesquisando o fundo, as bordas e os diferentes estratos de vegetação (OLIVER; SCHNEIDERMAN, 1956). Em todas as coletas foram registrados os seguintes dados:

- a) Nome do local;
- b) Nome da pessoa que coletou;
- c) Data e hora;
- d) Número total indivíduos coletados (espécies/30 conchadas/m²), em cada uma das estações;

- e) Cada ponto de coleta foi geo-referenciado com ajuda de um GPS (Sistema de Posicionamento Global), marca Magellan.

3.3.2.3 Fatores bióticos e abióticos

As variáveis bióticas que foram selecionadas são as seguintes: todas as espécies de moluscos e todas as espécies de plantas aquáticas encontradas nas áreas de coletas. Nos criadouros pesquisados as variáveis abióticas selecionadas foram: os tipos de habitat e os tipos de substratos presentes.

De todos os moluscos coletados em cada criadouro alguns foram selecionados aleatoriamente para a identificação taxonômica da espécie. Neste sentido, foi realizada a dissecação dos espécimes e sua identificação foi realizada com base em Souza e Lima (1997) e no “*Guide for the identification of the snail intermediate host of Schistosomiasis in the Americas*” (MALEK, 1974, 1985). Para os espécimens vegetais, a identificação foi feita com base no “*Guia de campo para identificação de plantas aquáticas*” (AMARAL et al., 2008).

3.3.2.4 Análise dos dados ecológicos pelo teste de Correlação Canônica (ACC)

Dentro dos modelos multivariados, encontra-se o teste de Correlação Canônica, o qual permite correlacionar diversas variáveis dependentes com diversas variáveis independentes. Para aplicar esta análise estatística foi necessário construir duas tabelas, (1) para as variáveis dependentes: abundância relativa de todas as espécies de moluscos coletadas e (2) para as variáveis independentes: bióticas (plantas aquáticas) e abióticas. Do cruzamento destas duas tabelas se originam quatro eixos ou ordenadas. A aplicação desta análise consiste em fazer a escolha dos eixos que maximizem a relação entre a combinação linear das variáveis independentes. Os resultados dessas ordenações foram representados sobre a forma de uma carta fatorial onde foram colocadas todas as variáveis independentes (tomando forma de uma nuvem de pontos) que estavam conectadas ao centro de gravidade dos eixos por meio dos vetores lineares (Figura 2). Desta forma, o ângulo que se formou da união dos vetores que tocaram as variáveis independentes indicaram uma correlação positiva entre essas e a variável

dependente e, no caso contrário indicaram uma correlação negativa (Figura 2). As variáveis que mostraram uma correlação positiva podem ser consideradas como indicadores da presença da variável dependente, ou seja, a presença de uma espécie em particular.

Este tipo de análise foi usado para estudar: a influência das variáveis ambientais (bióticas e abióticas) sobre a distribuição da abundância relativa das espécies do gênero *Biomphalaria*. Os dados das variáveis coletadas foram analisados com ajuda do *software Canoco versão 4,0* (BRAAK; SMILAUER, 1998). Além disso, usou-se a posteriori o teste de Monte Carlo para avaliar a hipótese de nulidade ou de ausência de estrutura canônica.

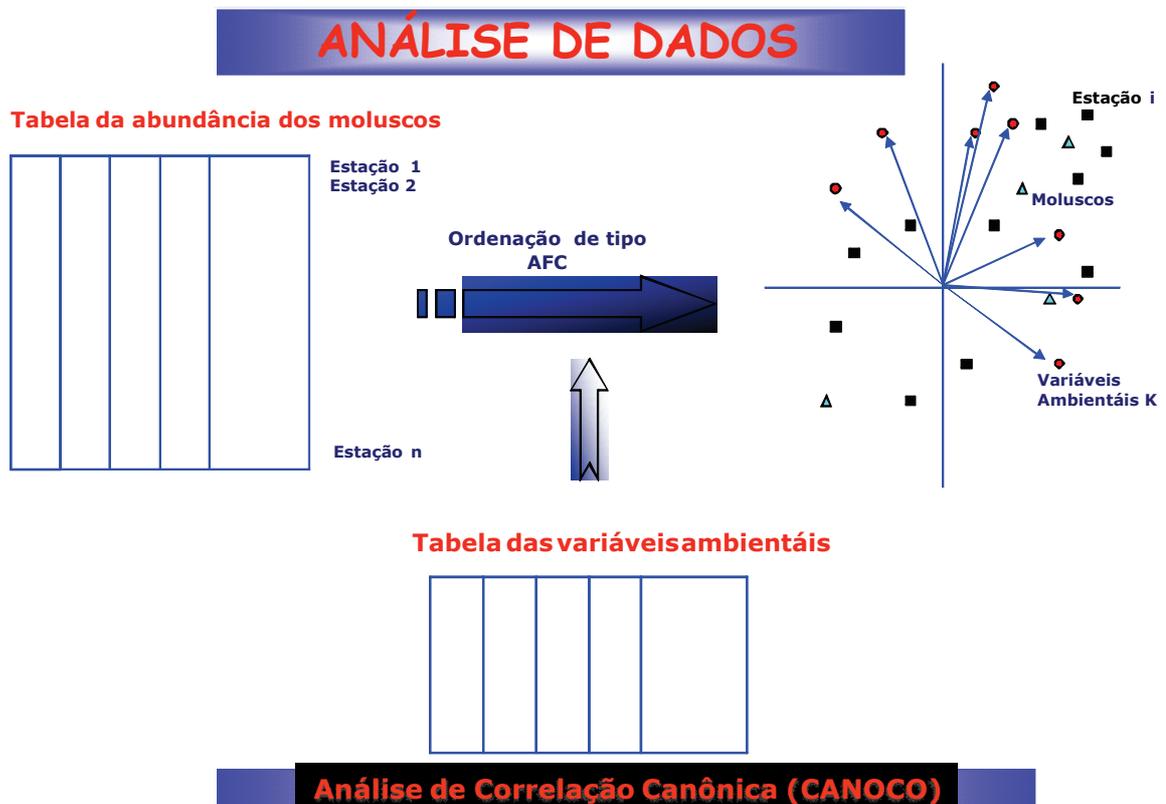


Figura 2. Esquema da construção da análise de correlação canônica.
Fonte: Adaptado de Braak (1986).

3.3.3 Taxa de infecção natural dos hospedeiros intermediários pela técnica tradicional e Nested-PCR

3.3.3.1 Positividade dos hospedeiros intermediários

As amostras do gênero *Biomphalaria* analisadas através da metodologia tradicional (exposição direta à luz) e a abordagem molecular (Nested-PCR) correspondem as coletas realizadas durante o ano 2008, nos municípios de: Timbaúba, Goiana, Itamaracá, Paulista, Olinda, Recife, Jaboatão dos Guararapes, Gameleira, Ipojuca, Igarassu, e Tamandaré.

3.3.3.2 Método convencional

Um dia após cada coleta de campo, os caramujos foram colocados individualmente em cubas (100 cm³) contendo água desclorada, e submetidos à foto-estimulação artificial direta (lâmpada de 60 W), durante aproximadamente 1 hora para a verificação da positividade para *S. mansoni*, através da emissão de cercárias (KUNTZ, 1946). A taxa de infecção natural (TIN) foi determinada através da fórmula:

$$\text{TIN} = \text{N}^{\circ} \text{ de moluscos parasitados} / \text{N}^{\circ} \text{ de moluscos coletados} \times 100.$$

As avaliações posteriores foram realizadas duas vezes por semana durante um período de 40 dias após a coleta.

3.3.3.3 Abordagem molecular

Como ferramenta de diagnóstico complementar foi usada a técnica Nested-PCR (ABATH et al., 2002; MELO, 2006), para identificar a presença do DNA do parasito *S. mansoni* nos caramujos coletados no campo. A aplicação desta técnica foi feita nos moluscos

Biomphalaria que resultaram negativos depois de serem avaliados pela metodologia convencional. Essa abordagem molecular foi antecedida pelos seguintes procedimentos: extração e quantificação do DNA e a realização da Nested-PCR.

3.3.3.3.1 Extração do DNA dos moluscos coletados no campo

Para a extração e purificação do DNA, usamos o protocolo desenvolvido por Melo (2006 p. 63):

A amostra tecidual do gênero *Biomphalaria* foi macerada, homogeneizada e suspensa em solução de lise (NaCl 100mM; TrisCl 10mM, pH 8; SDS 0,5%; Proteinase K 20mg/ml) na proporção de 1,2 ml/g de tecido e incubado a 60°C durante 1h; em seguida a amostra foi extraída uma vez com fenol, duas vezes com fenol/clorofórmio (1:1) e duas vezes com clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). A cada etapa de extração o homogenato era centrifugado a 5.000 rpm por 7 min. Após, desprezado o sobrenadante, o sedimento foi ressuspenso em álcool isopropílico absoluto gelado e centrifugado a 5000 rpm por 7 min. O “pellet” foi lavado uma vez com etanol a 70%, centrifugado e seco ao ar, durante 30 min. O sedimento foi ressuspenso em 1 ml de TE, incubado durante 1h a 42 °C, e armazenado a –20 °C, para posterior quantificação. Dois microlitros foram utilizados para PCR.

3.3.3.3.2 Descrição da técnica Nested-PCR

A Nested-PCR é uma adaptação da PCR convencional. Para esta fase do trabalho utilizou-se o sistema Nested-PCR em duas etapas, otimizado por Melo (2006, p. 66):

Foram utilizados dois pares de *primers* em duas reações sequenciais, em tubos diferentes em um total de 60 ciclos (30 ciclos cada). Na primeira reação, Schfo11 e Unvre16 foram utilizados como *primers* externos, enquanto que na segunda reação, uma alíquota do produto amplificado da primeira PCR (2 µl) serviu como molde para uma nova amplificação utilizando *primers* (Schfo17 e Schre19) que anelam em região interna ao amplicon produzido na primeira reação. Para que os amplicons gerados na primeira PCR, sejam introduzidos na segunda reação, há necessidade de abrir o tubo da primeira reação. As misturas das reações de amplificação consistiram em KCl 50mM, Tris – HCl 10 mM, pH 8,3, MgCl₂ 1,5mM, dNTP 0,2mM (Amersham Pharmacia Biotech, USA), 50 pmol de cada *primer* e 2,5 unidades de Taq DNA polimerase. Na 1ª reação, a fase de desnaturação foi realizada a 92°C por 30 s, a de anelamento a 65°C por 1 min. e a de extensão a 75°C por 1 min., em um total de 30 ciclos. Na segunda PCR as condições de ciclagem foram quase as mesmas, mudando apenas a temperatura de anelamento para 58°C. Em paralelo, foi desenvolvida uma hemi-Nested (HNPCR). Nessas abordagens, Schfo17/Unvre16 e Schfo17 e Schre19, foram utilizados como pares de iniciadores externos e internos, respectivamente. Schfo17 e Unvre16 produziram um amplicon de 793 pb.

Enquanto aos iniciadores Schfo17 e Schre19 produzem um amplicon de 721 pb. Além disso, o uso desta ferramenta permitiu aumentar a sensibilidade em comparação com a PCR convencional, estimando-se sua especificidade entre 85% a 93,8% (MELO et al., 2006).

3.4 Resultados

3.4.1 Distribuição geográfica do gênero *Biomphalaria* nos municípios selecionados

Foram identificadas as seguintes espécies de moluscos de importância médica: *Biomphalaria glabrata*, *B. straminea* e *B. schrammi* (família: Planorbidade) e *Lymnea collumela* (família: Lymnaeidae). Também se identificou: *Pomacea insularum* (família: Ampularidae), *Thiara granifera* e *Melanoide tuberculata* (família: Melanidae), *Physa marmorata* (família: Physidae) e *Depanotrema cimex* (família: Planorbidae). Além disso, identificou-se uma abundância relativa importante das duas espécies de molusco da família Melanidae na Zona da Mata norte e nas áreas litorâneas.

Pela primeira vez foi registrada a presença de *B. straminea* em ambientes costeiros dos municípios: Itamaracá (Forte Orange), Paulista (Janga), Olinda (Bultrins e Jardim Fragoso) e Goiana (Ponta de Pedra). *B. schrammi* foi encontrada a menos de 100 metros do mar, na localidade de Ponta de Pedras (Goiana) e *B. glabrata*, foi identificada em localidade típica da Zona da Mata (Impoeira), no município de Goiana (Figura 4). *B. glabrata* e *B. straminea* foram encontradas compartilhando as mesmas localidades litorâneas em Forte Orange, Olinda e Janga. No Janga estas espécies estavam compartilhando o mesmo habitat.

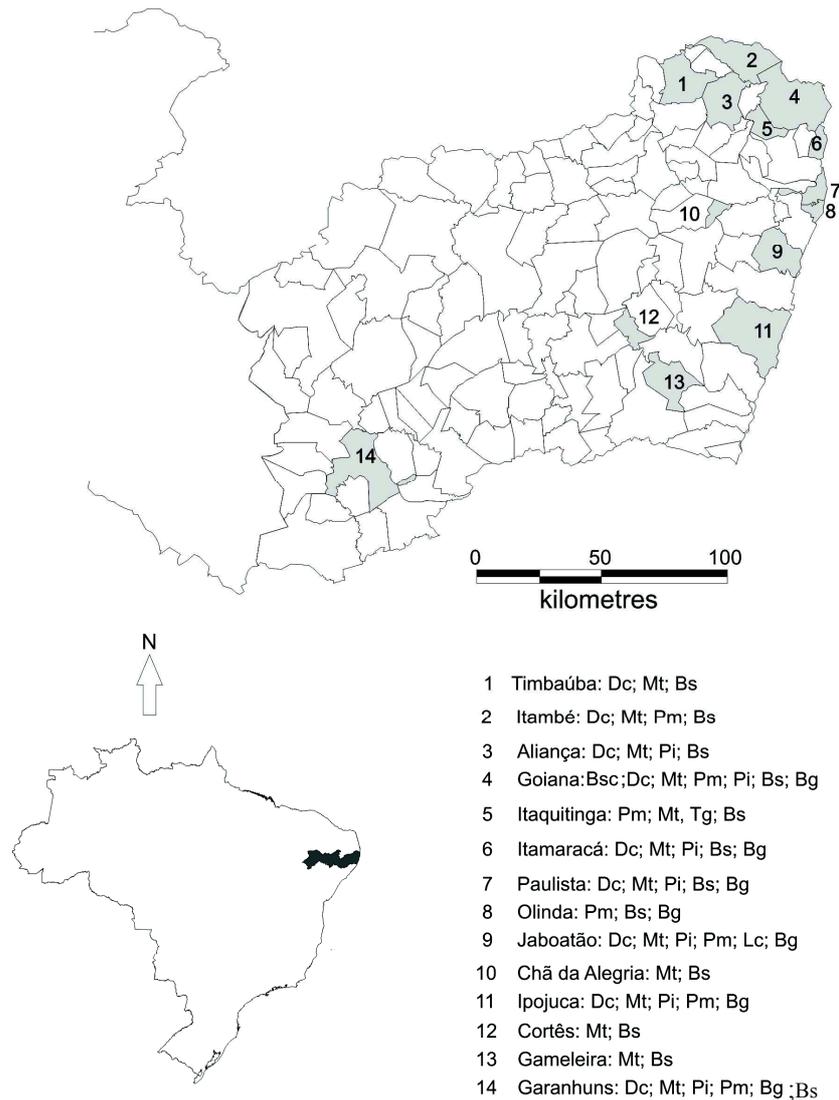


Figura 3. Distribuição geográfica das espécies de moluscos de importância médica.

Nota: Espécies de moluscos: *Biomphalaria glabrata* (Bg), *B. straminea* (Bs), *B. schrammi* (Bsc), *Lymnea collumela* (Lm), *Pomacea insularum* (Pi), *Thiara granifera* (Tg), *Melanoide tuberculata* (Mg), *Physa marmorata* (Pm) e *Depanotrema cimex* (Dc).

3.4.2 Influência dos fatores bióticos e abióticos sobre a distribuição geográfica do gênero *Biomphalaria* nos municípios selecionados

Em relação aos aspectos ecológicos de *B. glabrata* encontrou-se que esta espécie ocupa uma diversidade de habitats permanentes (rios, regos, lagoas, poços e canais) e temporários (charcos, cacimbas e córregos), geralmente com sombra. As altas densidades populacionais desta espécie foram encontradas onde existe uma contaminação fecal direta e constante. Estes

habitats se caracterizaram por apresentar os seguintes tipos de substratos: barro, areia e pedra. Entre as plantas aquáticas identificadas nos criadouros avaliados estiveram: *Echornia crassipes*, *Pistia stratioste*, *Typha spp.*, *Nymphae lotus*, e muita gramínea, principalmente nos criadouros temporários formados por áreas alagadas pelas chuvas. Por outro lado, *B. straminea*, se encontrou nos habitats semi-permanentes como regos e córregos, com água transparente, de pouca profundidade, baixa contaminação fecal e com muita influência da radiação solar. Entre os substratos típicos desses habitats estiveram: argila, areia, pedras e, em alguns casos, barro. As vegetações observadas com mais frequência foram: *Nasturtium spp.* e gramíneas.

As análises multivariadas (ACC) mostraram que existe uma estrutura canônica, já que a hipótese de nulidade foi rejeitada. O primeiro eixo para as variáveis bióticas explica 83,8% da variação da distribuição geográfica dos moluscos ($p < 0,002$) (Apêndice A), e para as variáveis abióticas, o primeiro eixo explica 82,5% ($p < 0,004$) (Apêndice B). No caso de *B. glabrata*, as variáveis que mostram uma correlação positiva e explicam a presença deste molusco são: tipo de substrato (barro), vegetação (*N. lotus*, *E. crassipes* e *P. estratioste*) e habitats típicos, canais e lagoas. Para *B. straminea*, as variáveis que mostraram correlação positiva foram: tipo de substrato (areia, pedra, argila e barro+pedra), tipo de vegetação (*Nasturtium spp.* e gramíneas) e habitats típicos como: rego e cacimba (Figura 4 e 5).

3.4.3 Taxas de infecção natural dos hospedeiros intermediários determinadas pela técnica tradicional e Nested-PCR

As taxas de infecção detectadas no *Biomphalaria* através da metodologia convencional apontam a qualidade dos vetores *Biomphalaria glabrata* e *B. straminea* como responsáveis pela transmissão tanto em áreas litorâneas como rurais do Estado de Pernambuco (Tabela 1). Destaca-se a qualidade de vetor de *Biomphalaria glabrata* responsável pela manutenção de altas taxas de infecção nas localidades onde foi encontrada (Tabela 1).

Tabela 1. Infecção natural determinada através da técnica convencional nos *Biomphalaria glabrata* e *B. straminea* de dez municípios do Estado de Pernambuco, coletados no ano 2008.

Municípios	Localidades	<i>Biomphalaria glabrata</i>			<i>B. straminea</i>		
		Coletas	Positivos	%	Coletas	Positivos	%
Timbaúba	Cruangi	-	-	-	45	2	4,4
Goiana	Carne de Vaca	4312	44	1	-	-	-
	Impoeira	116	2	1,72	-	-	-
Itamaracá	Forte Orange	186	-	-	280	-	-
Paulista	Pau Amarelo	265	28	10,56	-	-	-
	Janga	376	-	-	338	3	0,9
Olinda	Jardin Fragoso	62	1	0,62	125	-	-
	Bultrins	-	-	-	35	-	-
Recife	Apipucos	-	-	-	18	-	-
Jaboatão Dos Gurarapes	Dom Helder 1	52	2	3,85	-	-	-
	Dom Helder 2	1071	23	2,14	-	-	-
	Sotave 1	65	24	37,0	-	-	-
	Sotave 2	118	39	33,0	-	-	-
Gameleira	Santa Terezinha1	-	-	-	296	2	0,6
	Santa Terezinha2	-	-	-	335	4	1,19
Ipojuca	Porto de Galinhas	469	-	-	-	-	-
	Cabo de Santo Agostinho	-	-	-	33	-	-
Igarassu	Mangue Seco	-	-	-	89	-	-
Tamandare	Tamandaré	194	32	16,49	-	-	-

No que tange aos resultados da positividade obtida através da técnica Nested-PCR, fica patente o valor desta técnica como ferramenta complementar de diagnóstico uma vez que foi possível se detectar o DNA do parasito naqueles moluscos que não eliminaram cercárias pela técnica convencional. *Biomphalaria* diagnosticado como positivo através desta técnica evidencia a robustez da técnica Nested-PCR (Tabela 1 e Quadro 1).

Município	Localidades	Espécie	Positivo (+)/Negativo (-)
Itamaracá	Forte Orange	<i>B. straminea</i>	+
		<i>B. glabrata</i>	+
Goiana	Ponta de Pedras	<i>B. straminea</i>	+
		<i>B. glabrata</i>	-
Paulista	Janga	<i>B. straminea</i>	+
	Pau Amarelo	<i>B. glabrata</i>	-
Olinda	Bultrins	<i>B. straminea</i>	-
Recife	Apipucos	<i>B. straminea</i>	+
Ipojuca	Porto de Galinhas	<i>B. glabrata</i>	+
	Cabo de Santo Agostinho	<i>B. straminea</i>	+
Igarassu	Mangue Seco	<i>B. straminea</i>	-
Tamandaré	Tamandaré	<i>B. glabrata</i>	-

Quadro 1. Infecção natural determinada através da técnica Nested-PCR nos *Biomphalaria glabrata* e *B. straminea* de oito municípios do Estado de Pernambuco, coletados no ano 2008.

3.5 DISCUSSÃO

3.5.1 Distribuição geográfica dos moluscos do gênero *Biomphalaria* no Estado de Pernambuco

As coletas dos moluscos realizadas durante os anos 2007-2008 permitiram identificar a presença dos seguintes caramujos de importância médico-veterinária: *Biomphalaria glabrata*, *B. straminea*, *B. schrammi*, *Thiara granifera*, *Melanoide tuberculata* e *Lymnea collumela*. No Brasil, *Lymnea collumela* já foi incriminada como vetor da *Fasciola hepática* nas Regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste e em áreas dos Estados do Amazonas, Bahia e Paraíba (OLIVEIRA et al., 2007; UETA, 1976). Além disso, *Thiara granifera* e *Melanoide tuberculata* são conhecidas como eficientes competidores naturais de *B. glabrata* e *B. straminea* (AMARISTA; BARBOSA, 2009; CALLISTO et al., 2005; GIOVANELLI et al., 2003; GUIMARÃES et al., 2001; POINTIER; GUYARD, 1992; POINTIER et al., 1993; 1994; POINTIER, 2001, THIENGO et al., 2001). Durante nosso trabalho de campo foi possível evidenciar que a maior abundância relativa destes competidores foi observada na Zona da Mata Norte e nas áreas litorâneas, portanto, é possível pensar que estas espécies poderiam ter um papel determinante no futuro sobre a redefinição da distribuição geográfica do gênero *Biomphalaria*, nestas áreas.

Por outro lado, as coletas de moluscos do gênero *Biomphalaria* permitiram mostrar a existência das seguintes relações interespecíficas: a) *Biomphalaria glabrata* e *B. straminea* foram encontradas ocupando áreas geográficas diferentes; b) *B. glabrata*, *B. straminea* e *B. schrammi* foram observadas ocupando o mesmo município, mas separados por alguns quilômetros; e c) em uma única situação *B. glabrata* e *B. straminea*, ocuparam o mesmo habitat, mas em nichos separados o que permite hipotetizar a existência de uma segregação de nicho. Durante nossas observações de campo ficou evidenciado que em cada caso, cada uma das espécies mostrou uma afinidade específica para cada variável biótica e abiótica analisada. Foi possível descrever a nova distribuição geográfica das espécies de *Biomphalaria* em Pernambuco (Figura 3) como resultado complementar aos dados publicados pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2008) e aos dados obtidos pela expedição realizada pelo grupo de pesquisa Xistocanoe (BARBOSA et al., 2008).

O modelo multivariado (ACC) para avaliar a influência dos fatores bióticos e abióticos sobre a distribuição geográfica de *Biomphalaria* permitiu explorar a hipótese de segregação de nicho e, enriquecer a compreensão sobre as relações interespecíficas entre os moluscos *Biomphalaria*.

3.5.2 Influências dos fatores bióticos e abióticos sobre a distribuição de *B. glabrata* e *B. straminea*

A literatura científica que trata das condições controladas em laboratório mostram que *B. straminea* é uma espécie dominante (MICHELSON; DUBOIS, 1978; BARBOSA et al., 1981; 1984; BARBOSA, 1987; FAVRE et al., 2001). A principal característica que determina essa dominância sobre *B. glabrata* é o fato de mostrar altas taxas de reprodução, tanto por autofecundação como reprodução cruzada. Além disso, em alguns tipos de habitats e sob certas condições esta espécie consegue reduzir significativamente as populações de *B. glabrata* (BARBOSA, 1959; 1973; BARBOSA et al., 1981; 1984; FAVRE et al., 2001). Nossos trabalhos de campo evidenciaram que cada uma das espécies de *Biomphalaria* tem preferência por variáveis bióticas e abióticas diferentes corroborando a observação de Barbosa et al. (BARBOSA; BARBOSA 1994, 1995) sobre o fato dessas espécies serem ecologicamente excludentes. As análises de correlação canônica além de confirmar a separação geográfica também atestam a separação ecológica mostrando ausência de competição interespecífica.

Desta forma, pode-se dizer que a distribuição geográfica das espécies do gênero *Biomphalaria* está condicionada pelas variações climáticas, distúrbios naturais, alterações antrópicas e processos biogeográficos (competição inter e intra-específica, a pressão de seleção natural, segregação de habitat e nichos).

Dentro do contexto epidemiológico, a constatação do deslocamento das duas espécies de *Biomphalaria* assim como a separação ecológica e geográfica evidenciada em Pernambuco, são fatores que tem uma implicação direta na criação de novos focos de transmissão da esquistossomose, daí a importância da implementação de técnicas para o diagnóstico malacológico de infecção mais sensíveis como a Nested-PCR, para verificar a positividade para o *S. mansoni* no *Biomphalaria*. Além disso, apesar de ter observado níveis de compatibilidade diferenciada entre as duas espécies de *Biomphalaria* através das duas

técnicas de diagnóstico utilizadas, é possível pensar que estas espécies estão contribuindo de forma conjunta e/ou individual na distribuição geográfica dos parasitos de *S. mansoni*. Esta situação nos faz pensar sobre a seguinte pergunta: será que os níveis de compatibilidade ou susceptibilidade das duas espécies de moluscos estão exercendo uma pressão de seleção sobre a frequência e a distribuição geográfica dos perfis genéticos que estão circulando tanto na escala local como na regional? Uma consequência desta situação tem haver com o caráter focal e heterogêneo da epidemiologia da doença.

4 ARTIGO - INTERAÇÕES DAS CEPAS DE *Schistosoma mansoni* - *Biomphalaria* PRESENTES NO MUNICÍPIO DE GOIANA-ESTADO DE PERNAMBUCO

4.1 Introdução

O município de Goiana encontra-se na área endêmica (7°33'38" S e 35°00'09" W), entre a Zona da Mata e o Litoral do Estado de Pernambuco, com uma prevalência humana de 8,5% e média da intensidade de infecção igual a 78,3 opg (BARBOSA et al., 2006). Nesta região, a circulação do parasito e sua constante interação com os dois hospedeiros intermediários (*B. glabrata* e *B. straminea*), aliado ao esquema de medicações sistemáticas do Programa de Controle da Esquistossomose podem estar sendo responsável pela manutenção da variabilidade das cepas de *S. mansoni*. Nesta área se desconhece como é a interação parasito-molusco e, as implicações na dinâmica da transmissão da doença.

Em se tratando de susceptibilidade ou compatibilidade, é importante salientar que a associação específica parasito-molusco é modulada por filtros biológicos, ecológicos, bioquímicos, imunológicos e genéticos (ALVAREZ; DELGADO, 1999; NEWTON, 1953). O estado de desenvolvimento do molusco também influencia na susceptibilidade ao *S. mansoni* uma vez que foi comprovado que moluscos imaturos são mais suscetíveis que os maduros, pois possuem uma imunidade inata pouco desenvolvida (FERNADEZ; THIENGO, 2002; RICHARDS, 1973; 1975). Além disso, verifica-se que diferentes interações parasito-hospedeiro ocorrem com variadas combinações de populações de *B. glabrata* e *S. mansoni*, uma vez que, o status de resistência do molusco e a infectividade do parasito são geneticamente controlados (YOSHINO; VASTA, 1996). Sabe-se ainda que essas interações estão em estreita dependência com os componentes ambientais específicos de cada foco (AMARISTA, 1997; AMARISTA et al., 2001).

Dessa forma, este trabalho buscou avaliar a interação *S. mansoni*-*Biomphalaria*, em condições de campo e de laboratório em três localidades do município de Goiana-Pernambuco. Estes resultados elevaram o nível de compreensão da dinâmica da transmissão local.

4.2 Objetivos

4.2.1 Objetivo geral

Avaliar os níveis de susceptibilidade das interações *Schistosoma mansoni*-*Biomphalaria* em condições natural e de laboratório, das cepas presentes no município de Goiana-Estado de Pernambuco.

4.2.2 Objetivos específicos

- a) Determinar as taxas de infecção natural das populações de *Biomphalaria* presentes nas localidades selecionadas do município de Goiana;
- b) Analisar abundância relativa das populações de *Biomphalaria* presentes nas localidades selecionadas do município de Goiana;
- c) Avaliar os níveis de susceptibilidade das interações *Schistosoma mansoni*-*Biomphalaria* em condições de laboratório, das cepas presentes nas localidades selecionadas do município de Goiana.

4.3 Metodologia

4.3.1 Desenho de estudo

Foi eleito o município de Goiana (escala local), para realizar um estudo ecológico de corte transversal e experimental sobre as cepas dos parasitos e dos moluscos presentes nesta área. A finalidade desta parte do trabalho foi explicar a relação existente entre a dinâmica natural da abundância relativa de *B. glabrata* e *B. straminea* presentes nas localidades

selecionadas (Carne de Vaca, Ponta de Pedra e Impoeira) e a biologia das cepas de *S. mansoni* que foram encontradas circulando nessas áreas de estudo.

4.3.2 Dinâmica natural da abundância relativa e taxas de infecção das populações do *Biomphalaria*, presentes nas localidades de Carne de Vaca, Ponta de Pedra, do município de Goiana-PE

Para este estudo, foi seguida a mesma metodologia descrita no primeiro objetivo específico do primeiro capítulo, a qual corresponde tanto para a realização das coletas do *Biomphalaria* como para a verificação da positividade dos mesmos para o *S. mansoni*. Esta parte do trabalho foi realizada no período de junho de 2008 até maio de 2009. Foram solicitados ao Laboratório de Meteorologia do Estado de Pernambuco, os dados de temperatura e pluviometria do município de Goiana, correspondentes ao período de coleta, para observar se esta variável influencia sobre a abundância relativa e as taxas de infecção. Para isto foi utilizado o **Modelo Linear Generalizado Univariado** (MLGU), ferramenta estatística que incorpora os testes de hipóteses com o fim de avaliar o comportamento de uma variável dependente de contagem, em relação a um ou vários fatores que estão presentes dentro do grupo ou matriz analisada (NORUŠIS, 2008). Neste caso, nossas variáveis dependentes foram abundância relativa e taxas de infecção natural. Assim, a primeira variável foi definida nas seguintes categorias: nada, pouco abundante, e moderado-alta abundância. Com relação às taxas de positividade, estas foram definidas como: zero, baixa, moderadas-altas.

Por outro lado, a variável “período climático”, foi definida em concordância com os critérios de Barbosa e Favre (BARBOSA et al., 2000a; FAVRE et al., 2002). Desta forma, foram definidos os seguintes períodos climáticos: chuva ou inverno (abril-julho), pós-chuvas ou pós-inverno (agosto-novembro) e verão (dezembro-março).

4.3.3 Avaliação dos níveis de susceptibilidade das interações *S. mansoni* - *Biomphalaria* em condições de laboratório, com as cepas de *S. mansoni* presentes nas três localidades selecionadas no município de Goiana

4.3.3.1 *Isolamento das cepas de moluscos (B. glabrata e B. straminea)*

De cada lote dos moluscos coletados nas localidades de Carne de Vaca, Ponta de Pedras e Impoeira, foi obtido os ovos da primeira geração, mantidos em condições adequadas em laboratório, para obtenção das gerações F₁ e F₂. Posteriormente, a F₂ foi isolada para obtenção do número de indivíduos necessários com a idade e o tamanho definido para cada experimento. Para *B. glabrata* foi de 3-5 mm e para *B. straminea* 2 mm. Estes critérios foram definidos segundo informação obtida na literatura (FAVRE et al., 2001; FERNANDEZ; PIERI, 2001; FERNANDEZ; THIENGO, 2002).

4.3.3.2 *Isolamento das cepas de S. mansoni*

- a) Para as localidades de Carne de Vaca e Impoeira, os parasitos foram obtidos a partir das cercárias eliminadas por moluscos *B. glabrata* que se apresentaram positivos depois de avaliados através da metodologia convencional (exposição direta na luz).
- b) As cepas foram isoladas e os ciclos de vida foram desenvolvidos e mantidos no laboratório segundo protocolo descrito por Cesari e Alarcón (1987).
- c) Em Ponta de Pedras, o hospedeiro intermediário incriminado na transmissão de *S. mansoni* foi *B. straminea* e pela dificuldade na obtenção das cercárias, o parasito foi isolado a partir das fezes de um estudante, na faixa etária de 7-14 anos que residia na localidade há mais de cinco anos. Este caso foi selecionado através de inquérito coproscópico e coprológico realizado pelo Laboratório de Esquistossomose do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz. O isolamento da cepa de *S. mansoni* a partir das fezes humanas foi realizado através do seguinte protocolo:

1. Usou-se o método de Hoffman ou de sedimentação. As amostras de fezes foram filtradas através de um tamiz ou peneira, em seguida lavada com água destilada em cálice de 2.000 ml.
2. Após a lavagem, as amostras foram armazenadas na geladeira a 4 °C por 24 h.
3. Em seguida foi estimulada a eclosão dos miracídios, através do procedimento descrito, para se fazer a infecção dos moluscos. Uma vez verificada a positividade dos moluscos através da eliminação das cercárias seguiu-se a metodologia descrita por Cesari e Alarcón (1987), para lograr o isolamento do ciclo no laboratório.

4.3.3.3 Definição da dosagem ideal de miracídios para infecção dos moluscos

Foi estabelecida uma padronização do protocolo de laboratório para obter uma taxa de infecção experimental ideal, ou seja, uma dosagem de miracídio que infectasse mais de 90% dos moluscos a serem usados no experimento, com taxa de mortalidade próxima a 0%.

Foram desenvolvidas infecções com as combinações *S. mansoni* x *Biomphalaria* (cepas de referência do laboratório). Para tal fim, selecionaram-se as cepas de *B. glabrata* (Pontezinha-PE) e *B. straminea* (Itamaracá, Forte Orange-PE), com diâmetro de concha entre 3-5 mm e 2 mm, respectivamente. Para a definição da dosagem ideal de miracídio, os moluscos *B. glabrata* foram expostos a cinco doses: 1, 3, 5, 8 e 10 miracídios com a cepa *S. mansoni*-BH (Belo Horizonte-MG). Os moluscos *B. straminea* foram submetidos às seguintes doses: 1, 5, 10 e 15 miracídios, expostos a mesma cepa *S. mansoni*-BH. Para cada ensaio foram selecionados 20 moluscos e houve um grupo controle. Avaliaram-se os seguintes parâmetros:

- a) Taxa de infecção do laboratório: N° moluscos parasitados / N° moluscos expostos ao miracídeo de *S. mansoni* X 100
- b) Período pré-patente: O intervalo desde o momento da infecção até a eliminação das primeiras cercárias.
- c) Taxa de positividade e sobrevivência período patente: No último dia de avaliação
- d) Taxa de mortalidade dos moluscos: N° moluscos mortos expostos aos miracídios / N° total dos moluscos usados X 100.

4.3.3.4 Susceptibilidade das cepas de *S. mansoni* - *Biomphalaria* (município de Goiana)

Após atingir o tamanho adequado de 3-5 mm para *B. glabrata* e 2 mm para *B. straminea*, a geração da F₂ foi submetida às infecções usando as doses de miracídio padronizadas como ideal e a dose de 1 miracídio (1M). Deste modo, foram feitas infecções usando tanto a cepa de parasito como de molusco da mesma localidade, além disso, foram feitas infecções misturando as cepas de *S. mansoni* das três localidades com as cepas dos moluscos presentes nas localidades de estudo. As variáveis avaliadas foram: período pré-patente, taxa de infecção experimental e taxa de mortalidade.

4.3.3.5 Análise dos dados para a construção do modelo experimental: *S. mansoni* – *Biomphalaria*

4.3.3.5.1 Modelo Linear Generalizado Univariado (MLGU)

Este modelo estatístico foi aplicado através do *Software SPSS, versão 13* (SPSS, 2004), para analisar em nível experimental a relação do comportamento das cepas isoladas tanto do *S. mansoni* como do gênero *Biomphalaria*, das três localidades de estudo no município de Goiana. Este modelo estatístico subsidiou a análise do conceito de virulência do parasito e o conceito de susceptibilidade do molusco. No primeiro caso a variável dependente foi a cepa do parasito, e as variáveis independentes foram: cepas dos moluscos, doses de miracídios, taxa de infecção experimental, taxa de negatividade e taxa de mortalidade. A hipótese da pesquisa foi: H = “O alto nível de virulência da cepa de *S. mansoni* está associado a uma baixa compatibilidade na interação parasito-molusco de cepas alopátricas”.

Em relação ao molusco a variável dependente foi a taxa de infecção experimental e as variáveis independentes foram: cepas dos parasitos, doses de miracídios, tempo do período pré-patente e taxa de mortalidade. Neste caso, a hipótese da pesquisa foi: H = “O alto nível de susceptibilidade do *Biomphalaria* está associado a uma alta compatibilidade na interação parasito-molusco de cepas simpátricas”.

4.4 Resultados

4.4.1 Dinâmica da abundância relativa e taxas de infecção das populações do *Biomphalaria* nas três localidades selecionadas no município de Goiana

4.4.1.1 Localidades litorâneas

a) Carne de Vaca

Foram coletados 3.649 *B. glabrata*, no período de junho 2008 a maio de 2009 nas 11 estações de coleta (numeradas de 1 a 11) demarcadas. Com relação à queda na abundância relativa dos moluscos foi verificado que esta coincide com a queda da pluviometria (Gráfico 1) e o aumento da temperatura verificada nos meses de estiagem (Gráfico 2). As variações da abundância relativa vão de 919 moluscos coletados no mês de junho 2008 a 95 moluscos no mês de fevereiro 2009. As estações N° 5 e 6 apresentaram as maiores abundâncias relativas e nestas foram encontrados moluscos positivos eliminando grande quantidade de cercárias de *S. mansoni* nos meses de junho e julho 2008 (Apêndice C). A taxa de infecção natural na estação N° 5 foi de 3,15% e 6,6% para o mês de junho e julho de 2008. No caso da estação N° 6, foi de 2,2% durante o mês de julho do mesmo ano e 1,3% em março 2009 (Apêndice C). A taxa de infecção natural dos moluscos coletados em Carne de Vaca durante o período 2008 - 2009 foi de 0,55%.

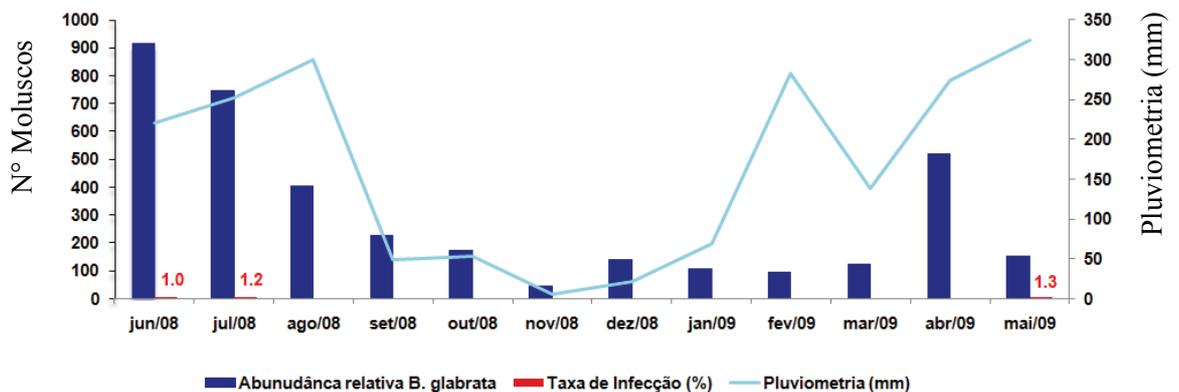


Gráfico 1. Pluviometria, Taxas de infecção natural e abundância relativa dos *Biomphalaria glabrata* coletados na localidade de Carne de Vaca, município Goiana-PE, 2008 - 2009.

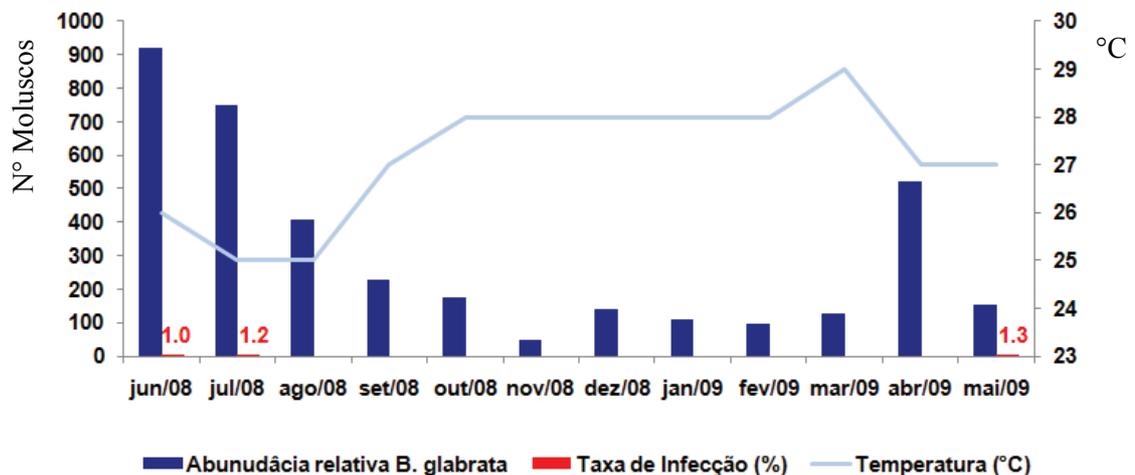


Gráfico 2. Temperatura, Taxas de infecção natural e abundância relativa dos *B. glabrata* coletados na localidade de Carne de Vaca, município Goiana-PE, 2008 - 2009.

O modelo linear generalizado univariado (MLGU) mostrou que existe uma forte correlação positiva e significativa ($r= 0,67$; $p<0,0001$) entre a variável abundância relativa moderada-alta e as variáveis ambientais analisadas (temperatura, pluviometria, período climático e pontos de coleta). Mas, as variáveis que melhor explicaram a abundância relativa de *B. glabrata* foram: ponto de coleta, temperatura e períodos climáticos ($r= 0.625$; $p<0.0001$).

b) Ponta de Pedras

Foram capturados um total de 5.687 *B. straminea*, de junho 2008 a maio de 2009, em oito estações de coletas (Apêndice E). A análise da abundância relativa dos moluscos variou de 1.278 (agosto 2008) a 22 (fevereiro 2009) (Gráfico 3). Esta queda também coincide com a diminuição da pluviometria e o aumento da temperatura (Gráficos 3 e 4). A taxa de infecção foi 0% durante todo o período.

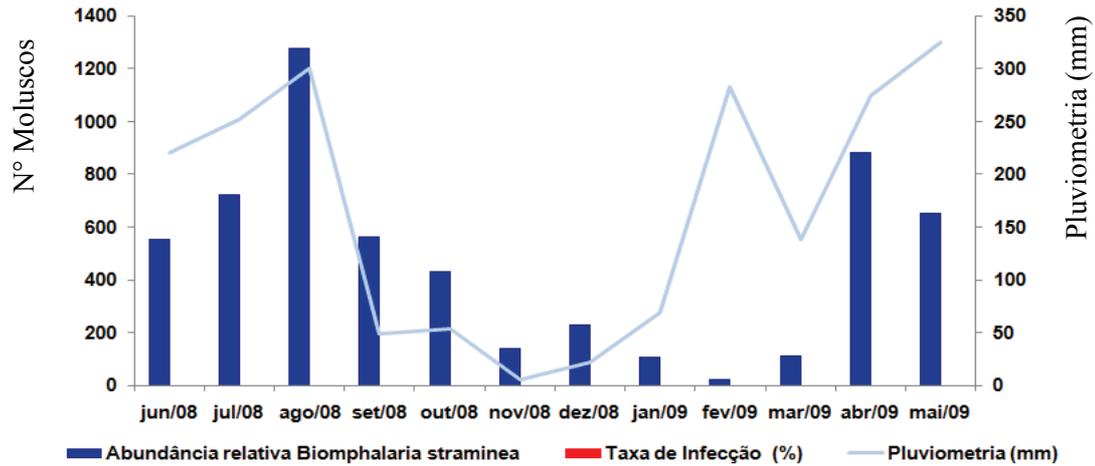


Gráfico 3. Pluviometria, Taxas de infecção natural e abundância relativa de *Biomphalaria straminea* coletados na localidade de Ponta de Pedras, município Goiana-PE, 2008 - 2009.

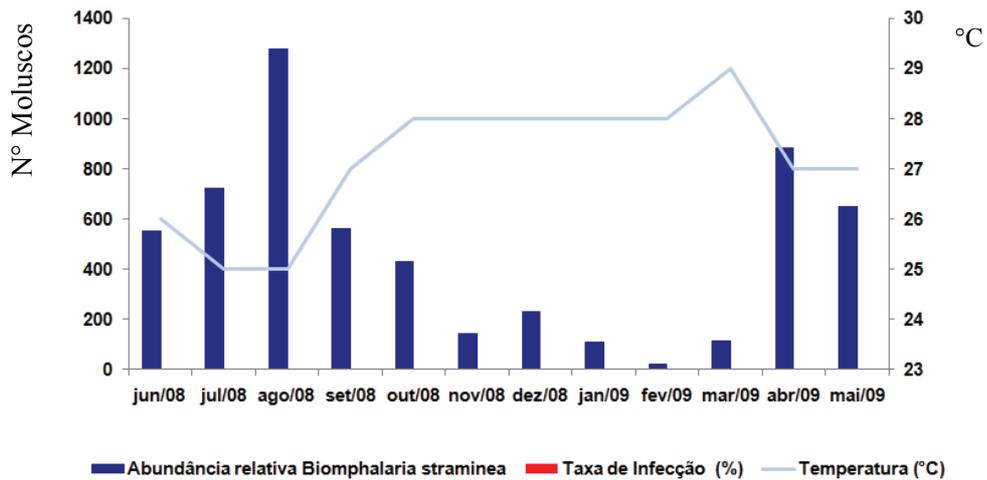


Gráfico 4. Temperatura, Taxas de infecção natural e abundância relativa de *Biomphalaria straminea* coletados na localidade de Ponta de Pedras, município Goiana-PE, 2008 - 2009.

Com relação aos resultados do MLGU para *B. straminea*, o modelo mostrou que existe uma forte correlação positiva e significativa entre a variável abundância relativa moderada-alta e pluviometria ($r= 0,675$; $p<0,0001$). Desta forma, uma queda da pluviometria e aumento da temperatura implica também uma queda da abundância relativa.

4.4.1.2 Localidade rural

a) Impoeira

Nesta localidade o total de moluscos coletados durante o período do estudo foi de 1.148 *B. glabrata*. Foram definidas 11 estações de coletas (Apêndice D). Também se observou que a queda da abundância relativa coincide com a diminuição da pluviosidade e o aumento da temperatura (Gráficos 5 e 6). O número de caramujos por mês de coleta variou de 210 (junho) a 40 (novembro) para o ano 2008 (Gráfico 5). As taxas de infecção natural por estação de coleta dos moluscos variaram de 15,4% a 2%. Durante o período 2008 - 2009 foi possível encontrar *B. glabrata* nas diferentes estações de coletas, eliminando cercárias de *S. mansoni*. A taxa de infecção natural dos moluscos coletados nesta localidade durante o período 2008 - 2009 foi de 3,4%, destacando-se os meses de outubro a novembro como os que exibiram as maiores taxas.

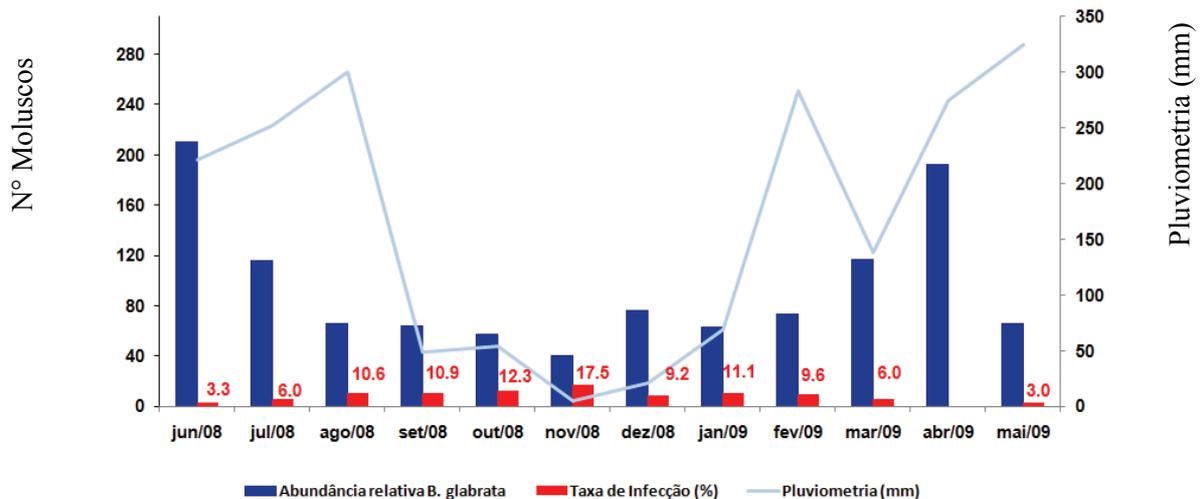


Gráfico 5. Pluviometria, Taxas de infecção natural e abundância relativa de *Biomphalaria glabrata* coletados na localidade de Impoeira, município Goiana-PE, 2008 - 2009.

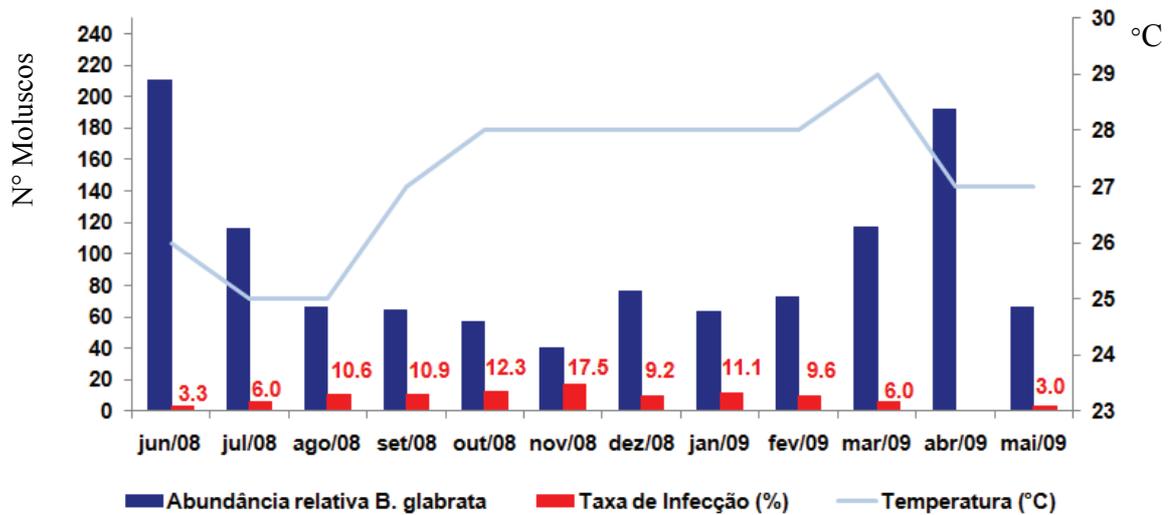


Gráfico 6. Temperatura, Taxas de infecção natural e abundância relativa de *Biomphalaria glabrata* coletados na localidade de Impoeira, município Goiana-PE, 2008 - 2009.

Com relação ao MLGU em Impoeira, também se verificou a existência de uma forte correlação positiva e significativa ($r=0,74$; $p<0,0001$) entre a variável abundância relativa moderada-alta de *B. glabrata* e as variáveis ambientais (temperatura e pluviometria). É interessante notar a interação das variáveis “períodos climáticos” e “pontos de coleta”, já que estas têm um peso importante na explicação da abundância relativa desta espécie de molusco. Em relação à positividade dos *Biomphalaria*, verificou-se uma forte correlação positiva e significativa ($r=0,91$; $p<0,0001$), e todas as variáveis ambientais (temperatura, pluviometria, períodos climáticos e pontos de coletas) tiveram um peso importante na explicação da dinâmica natural da infecção dos moluscos nesta localidade.

4.4.2 Avaliação dos níveis de susceptibilidade das interações *S. mansoni* - *Biomphalaria*, em condições de laboratório.

4.4.2.1 *Definição do protocolo das infecções experimentais usando as combinações das cepas de referência (Biomphalaria - S. mansoni)*

4.4.2.1.1 Combinação das cepas de referências, *B. glabrata* (Pontezinha-PE) - *S. mansoni* (BH)

A primeira avaliação para verificação da eliminação de cercárias começou a ser feita 18º dias após a infecção e no 23º dia foi observada a eliminação das primeiras cercárias indicando o fim do período pré-patente. Observou-se que o aumento na taxa de infecção experimental foi proporcional ao aumento da dose até 5 miracídios. Entre as doses de 8 m e 10 m não se observaram grandes diferenças tanto em relação à mortalidade como à taxa de infecção experimental (Tabela 2). A dose ideal definida a partir dos dois momentos da avaliação foi a de 5 miracídios por molusco para uma boa infecção.

4.4.2.1.2 Combinação *B. straminea* (Forte Orange, Itamaracá-PE) - *S. mansoni* (BH)

A primeira avaliação para verificação da eliminação das cercárias também começou a ser feita 18º dias após a infecção e somente no 27º dia foi observada a eliminação das primeiras cercárias indicando o fim do período pré-patente. Do mesmo modo o aumento da taxa de infecção experimental foi proporcional ao aumento da dose de miracídios mantida até a dosagem de 10 m (Tabela 3). O maior número de moluscos que não eliminou cercária correspondeu a doses de 15 m. A dosagem de 5 m foi considerada a ideal, por ser a menor dosagem, porque mata menos e parasita mais moluscos durante os dois momentos das avaliações.

4.4.2.2 Análise do modelo experimental (interação de combinações entre cepas *Biomphalaria-S. mansoni* isoladas a partir das três localidades selecionadas no município de Goiana, Pernambuco)

As combinações das cepas parasito-molusco de cada uma das localidades selecionadas que funcionaram e permitiram construir o modelo experimental com o fim de analisar as interações (*Biomphalaria-S. mansoni*) foram as de Carne de Vaca e Impoeira. No caso de Ponta de Pedra, a primeira infecção funcionou, mas no tempo não foi possível manter este ciclo no laboratório, portanto, para a construção do modelo MLGU não foi possível incluir os resultados obtidos das interações das cepas de *S. mansoni* de Ponta de Pedra com as cepas de *Biomphalaria* das localidades selecionadas.

Desta forma, o modelo experimental construído mostrou que existem diferenças importantes com relação às interações entre moluscos-parasita-localidade-doses de miracídeos durante o período pré-patente e patente (Tabela 4).

Tabela 4. Avaliação do efeito de duas doses de miracídeos (1m e 5m) das duas cepas de *S. mansoni* (Carne de Vaca e Impoeira) sobre as cepas *Biomphalaria* presentes no município Goiana-PE.

Cepas de <i>S. mansoni</i>	Cepas de Moluscos	Período Pré-Patente (dias)		Período Patente			
				Taxa de Infecção Experimental (%)		Mortalidade (%)	
		1m	5m	1m	5m	1m	5m
SM_CV1	Bg_CV1	33	26	5	10	0	5
	Bg_Impo2	24	21	50	45	10	5
	Bs_PP3	?	?	?	?	?	?
Sm_Impo2	Bg_CV1	26	26	25	55	10	20
	Bg_Impo2	22	22	5	10	0	10
	Bs_PP3	?	?	?	?	?	?

Nota: O símbolo de interrogação (?) significa que não foi possível determinar os períodos prepatentes e patentes, porque esses moluscos não eliminaram cercárias.

O MLGU permitiu rejeitar a hipótese de nulidade ao mostrar que as melhores interações (parasita-molusco) são mantidas entre as cepas alopátricas. Foi possível evidenciar que existem diferenças com relação às taxas de infecção experimental entre as cepas de moluscos nas diferentes combinações *Biomphalaria-S. mansoni*. Além disso, o MLGU mostrou uma correlação forte e positiva [R squared= 0, 910 (Adjusted R squared= 0, 858)]. A variável que melhor explica as diferenças observadas sobre a susceptibilidade foi cepas dos moluscos ($p < 0, 0001$). Não se encontrou diferenças estatísticas significativas sobre o comportamento das cepas de *S. mansoni*, mas se observaram diferenças entre as combinações das interações de moluscos-parasita- localidade-doses (Figura 6). Com relação à combinação BgIpu-SmCV, foi possível observar que a dose de 1m ocasionou maior mortalidade e conseqüentemente parasitou mais (Figura 6A). No caso contrário, a combinação BgCV-SmIpu, mostra que a dose de 5m parasita mais e mata mais (Figura 6E). Quando as infecções correspondem às combinações das cepas *Biomphalaria-S. mansoni* simpátricas, o comportamento do parasita e do molusco é semelhante entre as localidades, mostrando uma baixa positividade e mortalidade. Sobre as diferentes combinações feitas com a cepa de *B. straminea* da localidade de Ponta de Pedras foram evidenciadas taxas de infecção experimental de 0% (Figuras 6C e 6F). Estes resultados permitiram rejeitar a hipótese da pesquisa, porque as interações alopátricas foram as que mostraram maior nível de compatibilidade.

Com relação às taxas de negatividade dos moluscos vivos, nas diferentes combinações das cepas *Biomphalaria - S. mansoni*, o MLGU mostrou uma correlação forte e positiva [R squared= 0, 791 (Adjusted R squared= 0, 672)]. A variável que melhor explica as diferenças observadas foi cepas dos moluscos ($p < 0, 007$). Estes resultados também permitiram rejeitar a hipótese da pesquisa, já que o maior nível de virulência mostrado pelas cepas de *S. mansoni* correspondeu às interações mantidas entre as cepas simpátricas, evidenciando uma taxa de mortalidade maior e em conseqüência um baixo nível de compatibilidade (Figuras 7B e 7D). A maior taxa de sobrevivência foi evidenciada na cepa de molusco de Ponta de Pedras (Figuras 7C e 7F). Além disso, a cepa de *S. mansoni* da localidade de Impoeira foi mais virulenta por mostrar as maiores taxas de mortalidades dos moluscos (Figura 7).

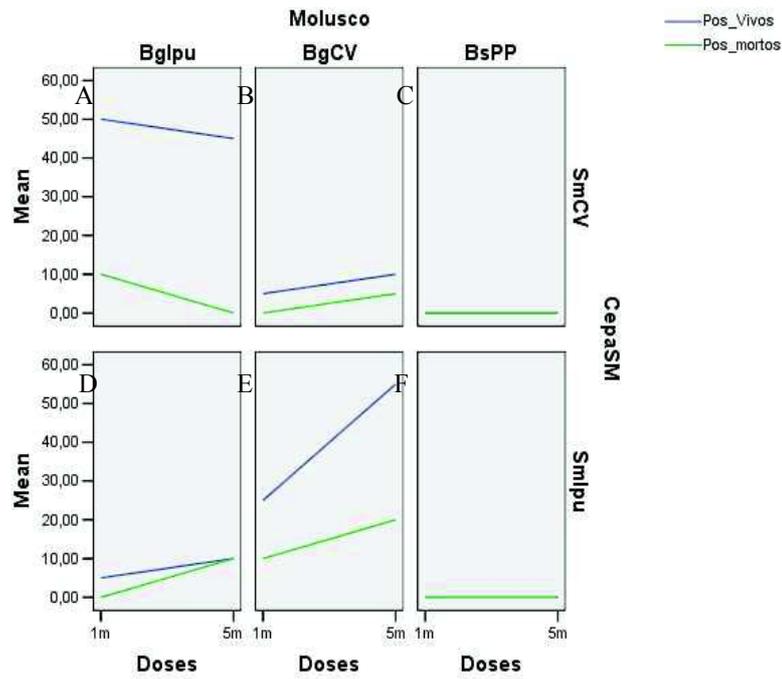


Figura 6. Análise da relação entre as variáveis das cepas de *S. mansoni* (Carne de Vaca: SmCV e Impoeira: SmIpu) e doses de miracidios (1m e 5m), sobre a sobrevivência dos *Biomphalaria* (Carne de Vaca: BgCV, Impoeira: Bglpu, e Ponta de Pedras: BsPP) parasitados.

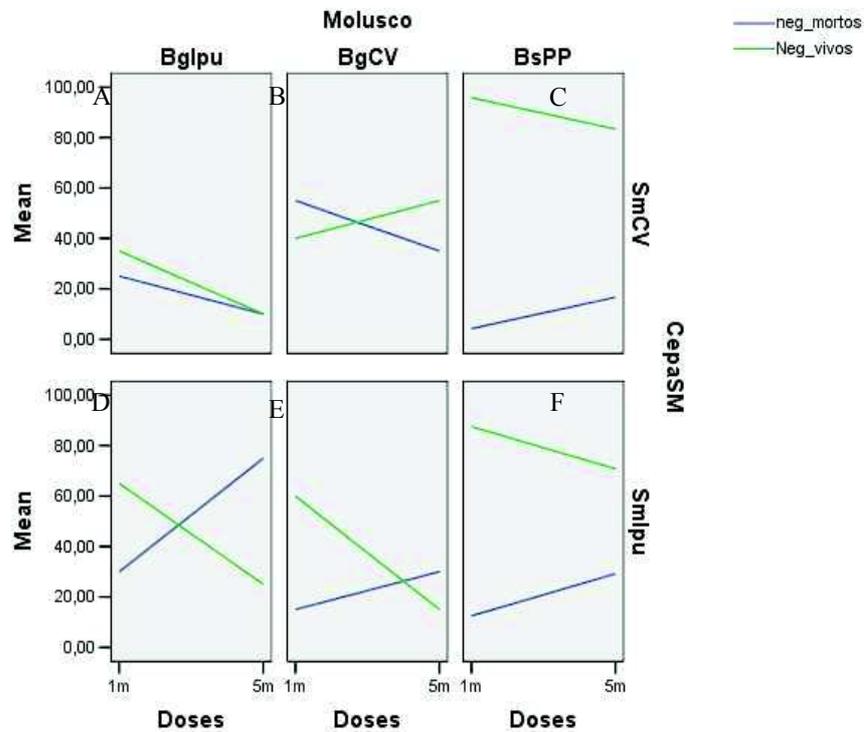


Figura 7. Análise da relação entre as variáveis das cepas de *S. mansoni* (Carne de Vaca: SmCV e Impoeira: SmIpu) e Doses de miracidios (1m e 5m), sobre a mortalidade dos *Biomphalaria* (Carne de Vaca: BgCV, Impoeira: Bglpu, e Ponta de Pedras: BsPP) que não eliminaram cercárias.

4.5 Discussão

Em Goiana a dinâmica natural da abundância relativa e as taxas de infecção determinadas nas localidades selecionadas mostraram que as variáveis ambientais (temperatura, pluviometria e períodos climáticos) têm um impacto importante sobre a fragmentação, extinção e re-colonização dos habitats do *Biomphalaria*. Desta forma, observou-se que a abundância relativa e as infecções naturais são específicas e heterogêneas, tanto para cada espécie de *Biomphalaria* como para cada um dos focos avaliados. Pode-se dizer que as duas espécies de *Biomphalaria* mostraram uma correlação positiva e significativa entre aumento das chuvas e aumento das suas populações. Estes achados estão em concordância com os resultados de Barbosa et al. (2000b) e Favre et al. (2002).

A avaliação feita no laboratório sobre a susceptibilidade das interações *S. mansoni* - *Biomphalaria* de cada uma das localidades selecionadas no município de Goiana estão em concordância com os resultados de campo. Na localidade de Impoeira verificou-se uma taxa de infecção natural alta durante o ano de coleta e em laboratório esta cepa de parasita mostrou alta taxa de infectividade e nível de virulência alto quando comparado com os dados da literatura (SOUZA et al., 2008; FAVRE et al., 2002). A cepa de *S. mansoni* de Carne de Vaca, mostrou uma taxa de infecção natural baixa e em laboratório se mostrou menos virulenta, apesar de exibir uma capacidade de infecção maior. Com relação aos moluscos de Ponta de Pedra, evidenciou-se tanto no campo como no laboratório uma taxa de infecção de zero. Assim, esta interação aponta um baixo nível de compatibilidade (parasita-molusco) ou um certo nível de resistência. Dentro do contexto epidemiológico, estes resultados indicam que provavelmente os casos humanos identificados na localidade de Ponta de Pedra não sejam casos autóctones. Esta situação aponta a possibilidade dos moradores de Ponta de Pedras estarem se contaminando em focos mantidos tanto por *B. straminea* fora do município como por *B. glabrata* dentro ou fora deste município, destacando-se a importância da migração humana na dinâmica da relação parasita-hospedeiro.

Quanto ao contexto coevolutivo, percebe-se que a melhor estratégia do parasito para sua sobrevivência é manter uma interação alopátrica, ou seja, também circular dentro das cepas de moluscos de outras localidades. Nosso modelo experimental destaca como exemplo a interação entre as cepas dos parasitos-moluscos das localidades de Impoeira-Carne de Vaca. Nesta combinação se evidenciou um alto nível de compatibilidade uma vez que foram realizadas infecções cruzadas. Em acréscimo, evidenciou-se que para os moluscos a

manutenção das variabilidades das cepas de *S. mansoni* que estão circulando tem um custo menor, porque a sobrevivência deles não é afetada negativamente. Desta forma, é possível compreender as flutuações das variações genéticas para a resistência, infectividade e virulência dentro das populações naturais dos parasitas (WEBSTER et al., 2004). Nossos achados nos levam a formular as seguintes perguntas: as cepas que circulam nas localidades selecionadas são diferentes do ponto de vista genético? Se existem vários perfis genéticos circulando, será que alguns deste estarão passando por *B. glabrata* ou por *B. straminea*?

5 ARTIGO - ANÁLISES DA ESTRUTURA DOS PERFIS GENÉTICOS DAS POPULAÇÕES DE *Schistosoma mansoni* PRESENTES NO ESTADO DE PERNAMBUCO

5.1 Introdução

Os moluscos do gênero *Biomphalaria* são responsáveis por manter a distribuição geográfica do parasito *Schistosoma mansoni*, através da eliminação da cercária, fase de vida livre do parasito, que infecta os humanos. Nesta fase está a chave para a compreensão da dinâmica da transmissão e da diversidade da estrutura genética das populações de *S. mansoni* (ROLLINSON et al., 2001; SIRE et al., 2001), sendo de extrema relevância para se entender a evolução do parasito e a epidemiologia da doença (HUYSE et al., 2005). Além disso, já é sabido que a interação parasito-molusco está em estreita dependência de componentes ambientais (bióticos e abióticos) específicos de cada foco (AMARISTA, 1997; AMARISTA et al., 2001; SIRE et al., 2001), sendo possível destacar, em diferentes escalas geográficas, esses processos micro e macro evolutivos (HUYSE et al., 2005; RUDGE et al., 2008). No caso do Estado de Pernambuco (escala regional), se desconhece qual é a diversidade e como é a estrutura dos perfis genéticos das populações de *S. mansoni*.

No Brasil e no mundo, tem-se desenvolvido alguns estudos sobre a diversidade genética das populações de *S. mansoni*, que mostraram a existência de variações entre espécies e dentro das cepas (McCUTCHAN et al., 1984). Em acréscimo sabe-se que o polimorfismo genético do parasito pode estar associado a variações nas intensidades de infecção de caramujos e de humanos, a resistência a drogas, ao desenvolvimento do parasito no hospedeiro definitivo, a produção de ovos e as características da patogenicidade e da imunogenicidade induzida pelo parasito (ARAÚJO et al., 1980; CAMPOS et al., 1976; COLES et al., 1986; DIAS et al., 1993; DRESCHER et al., 1993; KATZ et al., 1972; McMANUS; HOPE 1993; ROLLINSON et al., 1986). Huyse et al. (2005) afirmaram que a expressão desta variabilidade genética pode ser determinada pela influência de fatores ecológicos e biológicos como a reprodução cruzada dos parasitos, o uso de vários tipos de hospedeiros (intermediário e definitivo), a distribuição geográfica dos hospedeiros, e a migração destes (parasito e hospedeiros). Em relação ao *S. mansoni*, estes fatores são responsáveis pelo processo de seleção dos genótipos, mantendo a heterogeneidade genética

das sub-populações dos vermes adultos garantindo o sucesso da infecção pelo parasito e em consequência contribuindo para a dinâmica da transmissão.

No tocante aos aspectos eco-epidemiológico da transmissão da esquistossomose em Pernambuco, sabe-se que esta ocorre durante todo o ano devido aos criadouros permanentes de moluscos e a exposição constante dos moradores às coleções hídricas para atividades agrícolas, domésticas ou de lazer (BARBOSA et al., 1998; 2001; STEINMANN et al., 2006). É uma endemia ligada à pobreza em uma região onde as condições sócio-econômicas e eco-epidemiológicas são favoráveis à transmissão e onde as pessoas não têm acesso a ações de controle eficientes (BARBOSA et al., 1996). A prevalência e a intensidade da infecção da esquistossomose nas áreas endêmicas apresentam variações importantes, uma vez que estão relacionadas a uma combinação de fatores: (1) a contaminação das águas pelos ovos do parasito eliminados por pessoas doentes; (2) a presença e desenvolvimento das populações dos moluscos do gênero *Biomphalaria* susceptíveis ao parasito e (3) o contato direto das pessoas com águas contaminadas pelos moluscos parasitados. Dentro deste contexto, a migração das pessoas das áreas rurais endêmicas para os centros urbanos, em procura de emprego, contribui para a criação de novos cenários epidemiológicos e expansão da área endêmica. Esse novo contexto epidemiológico poderia estar associado com a variabilidade genética das populações de *S. mansoni*.

Por outro lado, a escolha da técnica e/ou marcador genético depende do modelo do estudo e da pergunta a ser respondida. Neste sentido, pesquisas desenvolvidas sobre genética de populações de *S. mansoni* mostraram o potencial das diferentes técnicas e/ou marcadores moleculares para mostrar a forte multiplicação dos genótipos (DABO et al., 1997; MICHELLA et al., 1995; SIRE et al., 1999; TIHELE et al., 2008; WEBSTER et al., 2007; ZHOU et al., 2009). Assim, a primeira técnica empregada nos estudos do polimorfismo genético utilizou isoenzimas, mas o avanço da biologia molecular possibilitou a abordagem desse tema através de novas técnicas como “Random Amplified Polimorphic DNA-PCR” (RAPD-PCR). Esta ferramenta apesar de possuir algumas limitações como, por exemplo, o uso de marcadores dominantes, apresenta baixo custo e permite com poucos *primers* caracterizar genótipos individuais do parasito, comparar as diferenças inter e intraespecífica nas sub-populações (BARRAL et al., 1993; 1996; DUMONT et al., 2007; JAMJOOM, 2006; LANGAND et al., 1999; SIRE et al., 1999; WELSH; McCLELLAND, 1990; WILLIAMS et al., 1990; PRUGNOLLE et al., 2002a; 2002b; 2006). Não obstante, com o desenvolvimento de projetos para sequenciamentos do *S. mansoni* em larga escala aumentou-se o interesse em descobrir novos tipos de marcador, como os Microsatélites e Polimorfismos de Base Única

(SNPs). A utilidade e o impacto do uso destes instrumentos têm sido evidenciados na literatura para as análises do polimorfismo entre indivíduos, populações e cepas de parasitos (GENTILE; OLIVEIRA, 2008; RORIGUES, 2007).

A aplicação das análises de *Networks* (algoritmos de bioinformática) e os modelos multivariados (análises de correspondência canônica) são instrumentos chave para compreender a biogeografia e a história evolutiva das espécies. O uso dos algoritmos *networks* para explicar as relações intra-específicas dos haplótipos (ou combinação de alelos ligados a multiples *loci*) de uma espécie, é de data recente (COUTINHO et al., 2008; HUSON; BRYANT, 2006; RAMOS et al., 2007; WOOLLEY, 2007; ZHAO et al., 2010). O *Median Joining Network* é um dos métodos de *networks* (BANDELT, 1999), de grande utilidade nos estudos de genética de populações por ser robusta na explicação dos processos de especiação e co-evolução das espécies (COUTINHO et al., 2008; JARNE; THERON, 2001; RAMOS et al., 2007; ZHAO et al., 2010). Outro aspecto importante da aplicação deste método é a possibilidade de avaliar hipóteses relacionadas com a dinâmica da transmissão que poderiam ajudar na compreensão da situação epidemiológica da doença.

Em vista do exposto acima, justificou-se o desenvolvimento de um projeto sobre o modelo *S. mansoni-Biomphalaria*, abordando a diversidade e a estrutura genética das populações de *S. mansoni* com a finalidade de ajudar na compreensão da dinâmica de transmissão da escala local. Foi examinada a hipótese: “A heterogeneidade da dinâmica de transmissão da esquistossomose na escala regional e local depende da conectividade geográfica e funcional dos focos, explica o padrão da estrutura genética das populações de *S. mansoni* e define o caráter focal da esquistossomose”.

5.2 Objetivos

5.2.1 Objetivo geral

Analisar a estrutura geográfica dos perfis genéticos das populações de *Schistosoma mansoni* presentes no Estado de Pernambuco.

5.2.2 Objetivos específicos

- a) Identificar os perfis genéticos das sub-populações de *S. mansoni* presentes tanto na escala regional (os municípios selecionados) como na escala local (localidades selecionadas no município de Goiana);
- b) Analisar a distribuição geográfica dos perfis genéticos das populações de *S. mansoni* presentes tanto na escala regional (os municípios selecionados) como na escala local (localidades selecionadas no município de Goiana).

5.3 Metodologia

5.3.1 Desenho de estudo

A escolha de vários municípios para isolar o ciclo biológico de *S. mansoni* e fazer as coletas de várias populações dos vermes adultos desta espécie do parasito uma vez no espaço e no tempo no Estado de Pernambuco permitiu a realização de um estudo ecológico de corte transversal, na escala local e regional.

5.3.2 Identificação do polimorfismo genético

5.3.2.1 Isolamento das sub-populações de *S. mansoni*

Todos os casos humanos positivos para *S. mansoni* de faixa etária de 7-14 anos foram diagnosticados pelo Laboratório de Esquistossomose do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE. As amostras fecais foram coletadas nas escolas públicas dos seguintes municípios: Goiana (Carne de Vaca, Ponta de Pedra, São Lourenço e Impoerira), Timbaúba (Cruangi), Nova Tiuma (São Lourenço da Mata), Pau Amarelo (Janga), Jaboatão dos Guararapes (Sotave e Lagoa de Náutico), Ipojuca (Porto de Galinha), Cortês (Usina União), Gameleira (Santa Terezinha). Além disso, selecionou-se o município de Garanhuns (Iratama) como o grupo fora da área endêmica, juntamente com mais 2 grupos externos: a cepa de SM do laboratório Campinas-SP/Linhagem R e cepa SM cedida pelo Laboratório de Esquistossomose do Centro de Pesquisas Renée Rachou/ MG, linhagem LE. Foram isolados ciclos de SM a partir de cada amostra fecal coletada. Nesta primeira fase do trabalho, a seleção destas amostras permitiu a identificação do polimorfismo genético.

Na segunda fase do trabalho, realizamos um estudo de genética de população do *S. mansoni*, para tal fim definiu-se como unidade de análise a população. Segundo Combes (1995, p. 60) população de parasitas é definida como: o conjunto de indivíduos de uma mesma espécie de parasito que habitam dentro de uma comunidade de hospedeiros. Em nosso caso, foram definidas nove populações de *S. mansoni* para análise na escala regional (São Lourenço da Mata, Goiana, Timbaúba, Paulista, Jaboatão dos Guararapes, Ipojuca, Cortês, Gameleira e Garanhuns), e na escala local foram definidas quatro populações (Carne de Vaca, Ponta de Pedra, São Lourenço e Impoerira) deste parasito.

Para o isolamento do ciclo biológico das populações de *S. mansoni*, foi usado o protocolo definido por Cesari e Alarcón (1987). Resumindo, cinco miracídios foram utilizados para infectar o *Biomphalaria* e obter a quantidade de cercárias necessárias para realizar a infecção dos camundongos (Swiss). Com o objetivo de se conseguir um quantitativo de vermes adultos significativos foi utilizada a dose de 120 cercárias/camundongo.

5.3.2.2 Coleta dos vermes adultos

Após 45-50 dias de infecção, os camundongos (Swiss) foram sacrificados através da técnica de perfusão hepática (DUVALL; DEWITT, 1967). De cada sub-população foram selecionados cinco vermes machos e cinco fêmeas, e em alguns foi coletada a quantidade de verme obtido. O conjunto de sub-populações isoladas de cada município constituíram nossa unidade de análise, quer dizer a população. Os vermes foram separados individualmente, colocados em micro-tubos, fixados em álcool absoluto e colocados no freezer a -20°C, para análises posteriores.

5.3.2.3 Extração do DNA genômico de *S. mansoni*

Antes de iniciar o procedimento da extração, foi necessário retirar o álcool presente nos micro-tubos com ajuda de um rotavapor de marca Eppendorf (Concentrator 5301). A extração individual do DNA de cada verme foi feita com ajuda do Mini spin Kit, marca GE Healthcare. O procedimento foi o seguinte:

- a) Colocou-se 100µL de solução de lise N°1 e depois as amostras foram passadas pelo vortex durante poucos segundos.
- b) Adicionou-se 5 µL de proteinase K e novamente as amostras passaram pelo vortex por segundos, depois foram colocadas na estufa a 56°C por 1h.
- c) O próximo passo foi colocar 500 µL de solução de lise N°2, passar as amostras pelo volter, esperando 10 min.
- d) As amostras foram centrifugadas por 10 sec. x 11.000 rpm, e transferidas para as colunas e centrifugadas por 1 min. x 11.000 rpm.
- e) O conteúdo foi passado para um novo tubo, e a ele foi adicionado 500 µL de solução de lise N°2. As amostras foram centrifugadas durante 1 min. x 11.000 rpm.
- f) Novamente a coluna foi passada para um novo tubo, colocando-se 500 µL de tampão de lavagem e centrifugada durante 3 min. x 11.000 rpm.
- g) O conteúdo foi transferido novamente de cada uma das colunas para novos micro-tubos. Posteriormente se colocou 100 µL de tampão de eluição e finalmente as amostras foram centrifugadas durante 1 min. x 11.000 rpm.

- h) O tampão eluição deve estar a 56°C, portanto, antes de iniciar a extração foi colocado na estufa.
- i) O DNA genômico extraído foi colocado no freezer a -20 °C.

5.3.2.4 *Quantificação e diluição do DNA*

A concentração do DNA do parasito e o grau de pureza de cada um das amostras foram determinados com ajuda de um espectrofotômetro (DU-65, Beckman instruments INC, UV/VIS, Glenrothes, Scotland e Bio-Rad, Modelo 3550, microplate Reader, E.U.A). A medida da absorbância usada correspondeu aos comprimentos de ondas de 260 e 280 nm. Segundo Melo (2001, p. 36): “Um valor unitário de absorbância a 260 nm corresponde a aproximadamente 50µg/mL de DNA dupla fita, 40µg/mL para DNA simple fita ou RNA”. Em seguida, o DNA de cada amostra foi diluído para a concentração de 1 ng/µL.

5.3.2.5 *Reações RAPD-PCR e eletroforeses*

Foi adotado o protocolo desenvolvido por Barral et al. (1993), incorporando poucas mudanças. A reação foi feita no volume final de 25 µL contendo 1-2 ng de DNA template, 10 mM de *primer*, 2,5 mM de dNTPs, 2,5 µL de tampão 10x (10mM de TrisCl pH 9,0, 50 mM KCl, 0.1% Trito X-100, Promega), 1,5 mM MgCl₂ e 1 U de *Taq* polimerase. As condições do programa foram: desnaturação inicial a 92 °C por 3: 50 min., em seguida, 40 ciclos compostos por desnaturação (35 °C por 2 min. e 72 °C por min.), anelamento e primeira extensão respectivamente, e por fim, uma extensão final de 72 °C por 8 minutos. Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose a 1% e corados por brometo de etídio. Para excluir a possibilidade de contaminação, para cada reação foi incluído o controle negativo, um tubo que continha todos os reagente exceto o DNA. A visualização do resultado do gel foi feita em transiluminizador UV, fotografado com uma câmara Polaroid (marca: EL LOGIC 100) e posteriormente digitalizado com ajuda do *software Molecular Imageing* (EASTMAN COMPANY KODAK, 1994-2005). Para garantir a reprodutibilidade do resultado, cada

reação foi repetida duas vezes em máquinas diferentes e a marca do termociclador usado foi Eppendorf® Mastercycle® Gradiente.

5.3.2.6 Iniciadores aleatórios (Primers)

Para este trabalho foram selecionados 5 primers de 10 oligonucleotídeos: OP-A9, 5'-GGGTAACGCC-3'; OP-A10, 5'-GTGATCGCAG-3'; OPA13, 5'-CAGCACCCAC-3'; OP-G13, 5'-CTCTCCGCCA-3'; OP-B6, 5'-TGCTCTGCCC-3'.

5.3.3 Análise da estrutura genética das populações de *S. mansoni* presentes nos municípios selecionados

Segundo Queiroz (2002 p. 55) “A técnica do RAPD-PCR permite a análise simultânea de vários locos do genoma, tornando-o bastante útil nos trabalhos voltados para a determinação da distância genética e das relações filogenéticas entre os organismos”. Neste sentido, as bandas ou locos observados através dos resultados obtidos desta técnica foram identificados como presença (1) ou ausência (0). Desta forma, o fato de encontrar todos os indivíduos com a mesma banda ou loco é considerado como monomórfica, caso contrário, se apenas alguns indivíduos apresentam a mesma banda, o loco é dito polimórfico (CLARK; LANIGAN, 1993). Além disso, os perfis genéticos para cada marcador foram construídos através das diferenças observadas entre o número e o peso molecular das bandas ou locos correspondentes aos indivíduos analisados. As identificações destes perfis foram feitas na medida em que iam aparecendo.

A técnica RAPD-PCR oferece algumas limitações quanto à determinação das frequências alélicas dos locos, pelo fato de ser um marcador dominante, portanto, não é possível estabelecer a distinção entre os indivíduos homozigotos dominantes e heterozigotos (WILLIAMS et al., 1990). Não obstante, de acordo com Queiroz (2002), é possível resolver este problema aumentando o número de indivíduos e assumindo as condições descritas por Apostol (1996 apud QUEIROZ, 2002, p. 56):

A saber: (1) os produtos RAPD segregam mendelianamente como marcadores dominantes; (2) as frequências genótípicas dos locos RAPD estão de acordo com as proporções de Hardy-Weinberg; (3) os alelos dos indivíduos homocigotos recessivos são idênticos por descendência; (4) os alelos dominantes amplificados são igualmente idênticos por descendência. Assumindo as condições citadas, a frequência de um alelo nulo a de um loco i numa população qualquer, será dada por: $q_j(i) = x_j(i)$, onde $x_j(i)$ é a frequência dos homocigotos recessivos nulos no loco i da sub-população j . A frequência do alelo dominante A pode ser inferida, considerando que $1 - q = p$.

Com ajuda do *Software livre POPGENE versão 1.31* (<http://cc.oulu.fi/~jaspi/popgen/popdown.htm>) foi possível determinar as frequências alélicas dos locos RAPD identificados com ajuda dos *primers* OP-A9, OP-B6 e OP-G13, e a partir daí, foram determinados outros parâmetros da estrutura genética das populações de *S. mansoni* nas escalas regional e local, como:

- a) O número de *loci* polimórficos (P) e a percentagem ($P\%$). A taxa de polimorfismo ($P\%$) é uma relação entre o número de locos polimórficos e o total de locos. Foi considerado um loco polimórfico quando a frequência de seu alelo principal (o mais abundante) foi menor que 0,95.
- b) Heterozigosidade média esperada (H_E) é considerada um parâmetro útil na quantificação da diversidade biológica das populações. Nei (1987) chamou esta medida de índice de diversidade gênica, demonstrando que ela é particularmente útil por poder ser aplicada em genes com diferentes níveis de ploidia e em organismos com diferentes sistemas reprodutivos.
- c) Nei (1977) define que o coeficiente G_{ST} é idêntico ao coeficiente F_{ST} . G_{ST} descreve a proporção da variabilidade genética existente entre as sub-populações (H_S), em relação à população total (H_T). A fórmula para determinar este parâmetro é a seguinte:

$$G_{ST} = 1 - H_S / H_T$$

Numa população ideal, na qual não são considerados os efeitos da migração, mutação ou da seleção natural, G_{ST} pode ser interpretado em função da deriva genética. De acordo com Wright (1978 apud QUEIROZ, 2002 p. 58):

Os valores assumidos por F_{ST} podem ser interpretados da seguinte forma: valores entre 0 e 0,05 indicam pequena diferenciação genética; entre 0,05 e 0,15 indicam diferenciação genética moderada; entre 0,15 e 0,25 indicam grande diferenciação genética; e valores acima de 0,25 indicam uma diferenciação genética muito grande entre as sub-populações consideradas.

- d) Estimativa da taxa de migração efetiva (Nm). Esta taxa é medida pela fração de m imigrante em uma população. Wright (1951) mostrou que a migração de um

indivíduo por geração de uma população para outra é suficiente para prever a fixação de diferentes alelos seletivamente neutros nessas populações. Os valores assumidos por Nm devem ser interpretados da seguinte forma: Se $Nm < 1$, as populações locais estão diferenciadas do ponto de vista genético, no caso contrário, $Nm > 1$ existe uma diferenciação pequena entre as populações (BOEGER et al., 1993).

- e) A distância genética (**D**) de Nei (1978). Segundo Avis (1994 apud QUEIROZ, 2002 p. 58): “Este número representa, de acordo com a sua definição original, o número de substituições de códons por loco, verificadas após o estabelecimento do isolamento geográfico entre duas populações”. Este parâmetro pode assumir valores que vão de 0 a 1, no caso de ser 0, estará indicando que as populações são idênticas e no caso de ser 1 as populações são completamente diferenciadas.

A partir da matriz de distância genética de Nei (1978) obtida pelo *software GENEPOP versão 1.31*, foi confeccionado o dendrograma UPGMA para cada uma das medidas de distâncias genéticas dos municípios analisados, para tal fim foi utilizado o *software MEGA versão 2.1* (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) (KUMAR et al., 2004). O dendrograma UPGMA foi construído assumindo que a taxa de evolução se mantém constante ao longo da história evolutiva dos grupos neles incluídos. Além disso, com ajuda de um GPS (Geography Position System) marca Meridian Magellan foram obtidos os dados de latitude e longitude de cada um dos municípios e das localidades de estudo. A partir destes dados e com ajuda do site: <http://home.hiwaay.net/~taylorc/toolbox/geography/geodist.cgi>, foi possível determinar a distância entre cada um dos municípios em quilômetros. Posteriormente foi confeccionada a matriz da distância geográfica e com ajuda do *software MEGA versão 2.1* foi confeccionando o dendrograma UPGMA da distância geográfica. Também foram confeccionadas as tabelas de: a) Distância genética e geográfica das populações de *S. mansoni* nos municípios selecionados; b) Distribuição da frequência do *loci* polimórfico das populações de *S. mansoni* dos municípios selecionados; e c) Estimativa do índice de fixação (F_{ST}) (WRIGHT, 1951) e do número de migrantes (Nm) encontradas nas nove populações de *S. mansoni* presentes no Estado de Pernambuco.

Por outro lado, foram realizadas as análises de correlação entre a distância genética e geográfica de cada par das populações selecionadas com a ajuda do *software* livre *BIOSTAT versão 5.0* (AYRES et al., 2007) e através do teste de Mantel (1967). Além disso, foram feitas 1000 simulações através do teste *Boostrat*, para examinar

nossa hipótese de nulidade: “A estrutura genética das populações de *S. mansoni* apresenta ausência de continuidade geográfica”.

5.3.4 Análise da distribuição geográfica dos perfis genéticos das populações de *S. mansoni* nos municípios selecionados através do modelo Median-Joining Network

O *Median Joining Networks (MJN)* foi aplicado através do *software livre Network versão 4.5.1.6* (FLUXUS TECHNOLOGY LTD., 2009). Antes de usar este *software* foi necessário passar os arquivos de cada grupo de sequências binárias (1= presença das bandas ou locos, e 0 = ausência das bandas ou locos) identificadas para cada um dos perfis por cada um dos *primers* para o formato mega e através do *software livre DnaSP versão 5.10* (ROZAS; LIBRADO, 2009) os arquivos foram formatados com a extensão rdf.

Neste estudo o *MJN* foi usado a fim de explicar a relação biogeográfica dos diferentes perfis genéticos identificados pelos *primers* selecionados (OP-A9, OP-B6 e OP-G13) para cada uma das escalas analisadas (regional e local). Os perfis genéticos foram considerados como a unidade evolutiva na compreensão da heterogeneidade da dinâmica da transmissão da esquistossomose.

O *MJN* é um algoritmo que tem sido de grande utilidade na genética de populações e o que o diferencia dos outros é que ele gera *the median vectors network* de acordo com o princípio de máxima parcimônia, permitindo a recombinação dos dados ou sequências binárias. Leva em conta os eventos de mutação e recombinação, a fim de minimizar o número de mudanças qualitativas necessárias na obtenção das árvores filogenéticas. Em relação a esta última parte, o *MJN* determina a distância entre as sequências binárias, tomando em conta o número de caracteres diferentes, dando peso a cada um deles. Desta forma, determina o seguinte: a) quais são as sequências que mantêm uma maior proximidade; e b) quais são as sequências que estão mais distantes e com quais se relacionam. Além disso, é possível visualizar a frequência com que aparecem as sequências nas diferentes sub-populações analisadas e sua distribuição geográfica. Na Figura 8, é possível visualizar um exemplo da relação de proximidade entre as sequências analisadas.

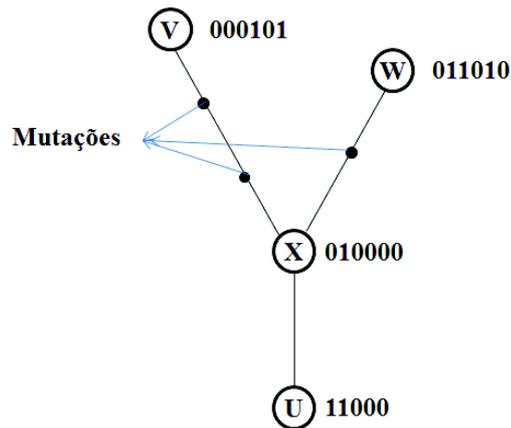


Figura 8. Median vector X of binary sequences U, V, and W
 Fonte: Adaptado de Bandelt et al. (1999).

Em relação à interpretação dos resultados obtidos através *MJN*, existem vários caminhos. Este trabalho se baseou na teoria de “*Coalescência*” (MORRINSON, 2005). Esta teoria é aplicada na genética de populações para sugerir a identificação do haplótipo ancestral e explicar a relação biogeográfica entre estes. No caso de nossos dados, esta teoria nos ajudará a compreender a biogeografia evolutiva dos perfis identificados através RAPD-PCR. Para tal fim é necessário aplicar os seguintes critérios: a) identificar o perfil mais frequente ou mais comum dentro das populações analisadas; b) identificar o perfil que tem o maior número de ramificações ou conexões com outros perfis e c) identificar o perfil que tinha uma boa representatividade do ponto de vista da distribuição geográfica (MORRINSON, 2005). Em acréscimo, a interpretação destes resultados permitiu examinar os modelos teóricos co-evolutivos chamados “*Red Queen* e *Custo-Benefício Trade Offs*”. Estes modelos teóricos foram usados para explicar a *Frequência-Dependência* dos perfis genéticos e o *Custo-Benefício* da manutenção dos polimorfismos dos parasitos por parte das duas espécies de vetores incriminadas (*B. glabrata* e *B. straminea*) na transmissão de cada um dos municípios selecionados.

Por outro lado, é necessário a compreensão da estrutura das figuras ou os *MJN* construídos para cada um dos *primers* analisados em cada escala geográfica (regional e local). É necessário indicar que cada município foi identificado com uma cor. No caso dos perfis genéticos, estes foram identificados com a letra “P e um número”, e a frequência dele nas áreas geográfica determinou o tamanho do círculo. Desta forma, foi possível esperar encontrar

que alguns perfis estiveram presentes em vários municípios, ou seja, o círculo que representou esse perfil apresentou um tamanho determinado e várias cores.

5.4 Resultados

5.4.1 Identificação do polimorfismo genéticos das populações de *S. mansoni* presentes nos municípios selecionados

Foram isolados os ciclos biológicos de *S. mansoni* através da coleta de material fecal de 28 casos humanos positivos para este parasito. Estas sub-populações estavam distribuídas da seguinte forma nos municípios selecionados: Goiana [Carne de Vaca (4), Ponta de Pedras (1), São Lourenço (2) e Impoeira (8)], Timbaúba [Cruangi (1)], São Lourenço da Mata [Nova Tiúma (1)], Paulista [Janga (1)], Jaboatão dos Guararapes [Sotave (1) e Lagoa do Náutico (2)], Ipojuca [Porto de Galinhas (1)], Cortês [Usina União (2)], Gameleira [Santa Terezinha (2)], Garanhuns [Iratama (2)]. Além disso, foram selecionadas duas cepas mantidas nos laboratórios de São Paulo/Linhangem R (1) e de Minas/LE (1). Trinta foi o total de sub-populações analisadas. Os números de vermes adultos analisados tanto na escala regional como local são apresentados nos Apêndices F e G respectivamente.

Em relação RAPD-PCR, cada reação foi realizada duas vezes em diferentes máquinas de PCR (ver os Apêndices Ja e Jb), para garantir a reprodutividade dos resultados. A Tabela 5 mostra o número dos perfis genéticos e o total de bandas identificadas para cada um dos *primers* avaliados. Em acréscimo, foi feito um gel resumo para cada *primer* com a finalidade de mostrar os diferentes perfis identificados (ver os Apêndices K, L, M, N e O).

Tabela 5. *Primers* usados na amplificação do DNA genômico das populações de *Schistosoma mansoni* selecionadas em municípios do Estado de Pernambuco.

<i>Primers</i>	Sequência 5'--3'	Nº de Perfis	Nº de Bandas
OP-A9	5'-GGGTAACGCC-3'	26	20
OP-A10	5'-GTGATCGCAG-3'	14	21
OPA13	5'-CAGCACCCAC-3'	19	23
OP-B6	5'-TGCTCTGCCC-3'	24	16
OP-G13	5'-CTCTCCGCCA-3'	16	17

5.4.2 Análise da estrutura genética das populações de *S. mansoni* presentes nos municípios selecionados

As análises sobre a amplificação dos perfis genético dos cinco *primers* testados mostraram que os *primers* OP-A9, OP-B6 e OP-G13 produzem variabilidade e reprodutibilidade. Neste sentido verificaram-se variações no tamanho dos fragmentos das bandas para cada um dos *primers* analisados (OP-A9= 396-2180 pb; OP-B6= 700-6108 pb; e OP-G13= 506-4072).

A variabilidade genética identificada a partir da análise desses *primers* permitiu verificar que os grupos genéticos se encontram distribuídos da seguinte forma nas áreas de estudo selecionadas em Pernambuco: a) 44,44% estão presentes nos municípios estudados da área litorânea; b) 33,33% entre a Região Metropolitana e a Zona da Mata Sul; c) 11,11% na Zona da Mata Norte; e d) 11,11% fora da área endêmica, em Garanhuns (Tabela 6). Em relação à diversidade genética, observa-se a formação de três grupos: a) Os municípios de Goiana, Paulista e Jaboatão dos Guararapes apresentam em média a maior diversidade genética dentro de cada uma de suas populações respectivamente (Tabela 6). Assim, nas inter-populações observou-se que o número de *loci* e a percentagem de *loci* polimórficos apresentaram os valores mais altos em comparação com todas as populações analisadas (Tabela 6). Mas, as inter-populações deste grupo são pouco diferenciadas e mais próximas entre si, porque mostram uma distância genética pequena (Tabela 7 e Figura 9); b) O segundo grupo é formado pelas populações dos municípios de São Lourenço da Mata, Cortês e Gameleira. Estes municípios exibiram uma diversidade genética média menor, assim como, um menor

Ecologia de Biomphalaria e Genética de Schistosoma mansoni

número de *loci* e de percentagem de *loci* polimórficos em comparação com o primeiro grupo; e c) No terceiro grupo estão os municípios de Timbaúba, Ipojuca e Gameleira, este grupo se diferencia do resto, e em consequência a distância genética e geográfica com relação aos outros grupos é maior (Tabela 7 e as Figura 9 e 10).

Em relação à distância genética de Nei's (1978), o valor mínimo foi de 0,0092 (entre Goiana/Jaboatão dos Guararapes) e o valor máximo foi de 0,2365 (entre São Lourenço da Mata/Garanhuns).

Tabela 6. Variabilidade genética dos *loci* RAPD-PCR em nove populações de *S. mansoni* do Estado de Pernambuco.

Variáveis		Timbaúba	Goiana	Paulista	São Lourenço da Mata	Jaboatão dos Guararapes	Ipojuca	Cortês	Gameleira	Garanhuns	Total
na	Média	1,32	1,96	1,68	1,47	1,96	1,58	1,53	1,70	1,32	1,98
	St. Dev	0,47	0,19	0,47	0,50	0,19	0,50	0,50	0,46	0,47	0,14
ne	Média	1,23	1,36	1,42	1,29	1,45	1,30	1,23	1,35	1,23	1,45
	St. Dev	0,33	0,29	0,36	0,36	0,34	0,34	0,29	0,37	0,37	0,34
h	Média	0,13	0,23	0,25	0,17	0,27	0,18	0,15	0,21	0,13	0,27
	St. Dev	0,20	0,16	0,20	0,20	0,17	0,19	0,17	0,20	0,20	0,17
N° loci		17,00	51,00	36,00	25,00	51,00	31,00	28,00	37,00	17,00	52,00
% loci polimórficos		32,08	96,23	67,92	47,17	96,23	58,49	52,83	69,81	32,08	98,11

Nota: **na** = Número de alelos observado; **ne** = Média do número efetivo de alelos [Kimura e Crow (1964)]; **h** = Nei's (1973) diversidade genética; **P** = Número de *loci* polimórficos; **P%** = Percentagem de *loci* polimórficos; St. Dev= Desvio padrão.

Tabela 7. Distância genética (cor cinza) e distância geográfica das populações de *Schistosoma mansoni* dos nove municípios selecionados no Estado de Pernambuco.

Municípios	Goiana	Timbaúba	São Lourenço da Mata	Paulista	Jaboatão dos Guararapes	Ipojuca	Cortês	Gameleira	Garanhuns
Goiana	*****	35,30	39,40	36,60	49,30	75,80	101,30	100,50	204,60
Timbaúba	0,0979	*****	56,00	63,30	64,60	86,20	91,30	97,70	181,60
São Lourenço da Mata	0,0921	0,1609	*****	17,60	9,90	36,50	71,70	65,50	182,70
Paulista	0,0638	0,0961	0,1642	*****	22,40	47,10	88,70	80,80	200,20
Jaboatão dos Guararapes	0,0092	0,0925	0,0828	0,0269	*****	26,80	66,90	58,40	179,30
Ipojuca	0,1191	0,0492	0,1617	0,0481	0,0864	*****	53,40	38,40	165,50
Cortês	0,0628	0,1465	0,0138	0,1402	0,0537	0,1555	*****	20,50	112,90
Gameleira	0,0489	0,1236	0,0312	0,0890	0,0325	0,1194	0,0292	*****	127,70
Garanhuns	0,1907	0,1457	0,2365	0,1436	0,1589	0,0591	0,2342	0,1860	*****

Nota: A distância geográfica foi determinada em Quilômetro.

No dendograma da distância genética (Figura 9), observou-se a presença de dois cladogramas: a) O primeiro está subdividido em dois cladogramas menores. O subclado 1 está formado por três populações (municípios: Goiana, Jaboatão dos Guararapes e Paulista), mas a população de Paulista aparece isolada das outras. Em relação ao subclado 2, ele está formado por três populações (municípios: São Lourenço da Mata, Cortês e Gameleira), neste caso a população que aparece isolada foi Gameleira; e b) O segundo clado está formado por três populações, mas duas populações aparecem juntas (municípios: Timbaúba e Ipojuca) e como população isolada se encontra Garanhuns. O dendograma da distância geográfica (Figura 10) mostrou um nível de consistência com relação ao dendograma de distância genética (Figura 9), embora, quatro municípios (Goiana, Timbaúba, São Lourenço da Mata e Ipojuca) apresentem pequenas distâncias geográficas, e grande distância genética entre elas (Tabela 7).

No que se refere ao critério proposto por Wright (1978) para interpretar os valores de F_{ST} , numa população ideal, na qual não são considerados os efeitos da migração, mutação ou da seleção natural, G_{ST} pode ser interpretado em função da deriva genética. Desta forma, observa-se na escala regional desta pesquisa que existe uma grande diferenciação genética (média de G_{ST} ou F_{ST} = 0,2995) entre os locos analisados pelos *primers* OP-A9, OP-B6 e OP-G13 presentes nas populações de *S. mansoni* dos nove município selecionados (Apêndice H). Mas, quando foi analisada a taxa de migração (Nm) entre as populações, o valor determinado foi $Nm = 1,1694$, o qual indica a existência de uma leve diferenciação genética entre as populações analisadas (BOERGER et al., 1993). As populações que se mostraram mais diferenciadas foram: Goiana/Garanhuns (distância genética = 0,190), São Lourenço da Mata/Garanhuns (distância genética = 0,236) e Cortês/Garanhuns (distância genética = 0,2342).

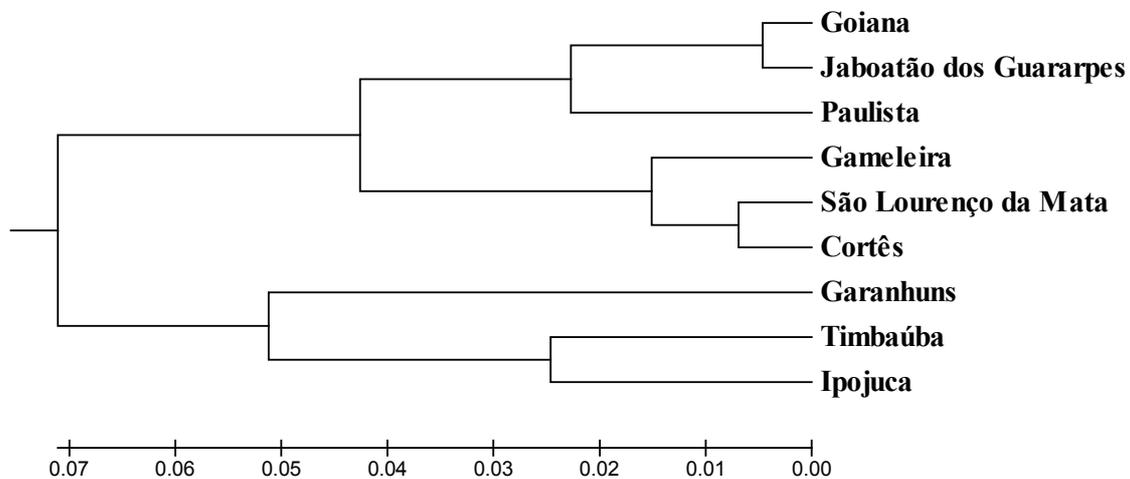


Figura 9. UPGMA Dendograma de Nei's (1978) distância genética entre as populações de *S. mansoni* em nove municípios do Estado de Pernambuco.

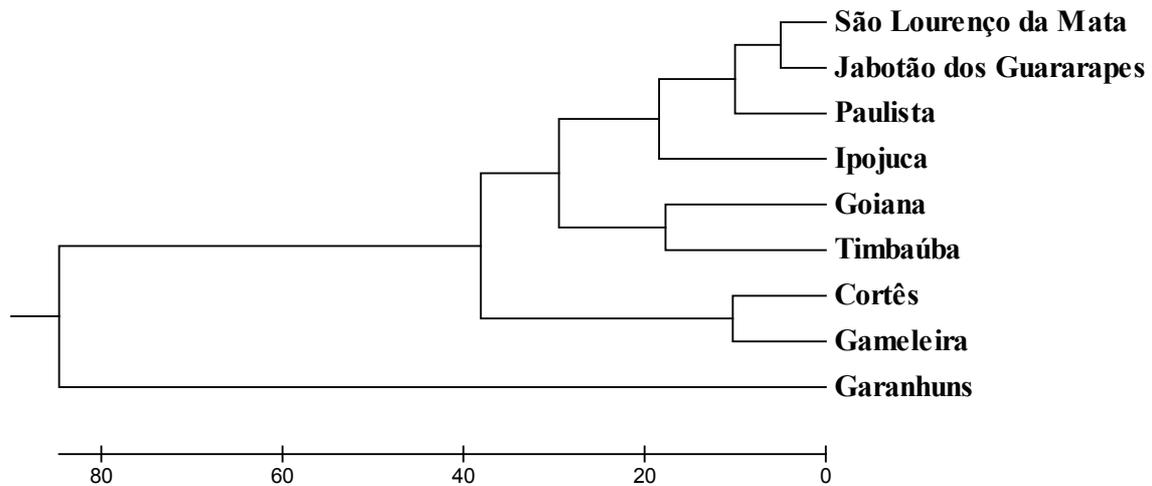


Figura 10. UPGMA Dendrograma da distância geográfica (em Km) entre as populações de *S. mansoni* em nove municípios do Estado de Pernambuco.

O teste de Mantel (1967) permitiu evidenciar um padrão de dispersão geográfico, devido à existência de uma correlação positiva (que vai de moderada a forte) e significativa ($r = 0,0534$; $p < 0,0001$) entre a distância geográfica e a distância euclidiana baseada na frequência das bandas identificadas através dos marcadores de RAPD-PCR (*primers* OP-A9, OP-B6 e OP-G13) de cada par das populações analisadas (Figura 11).

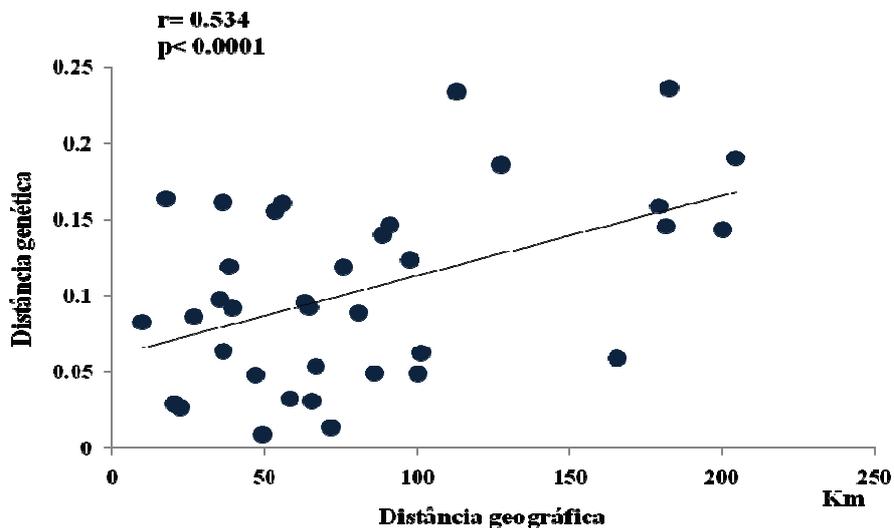


Figura 11. Correlação entre a distância genética e geográfica das populações de *Schistosoma mansoni* dos nove municípios selecionados no Estado de Pernambuco, usando o teste de Mantel com 1000 permutações ($r = 0.534$; $p < 0.0001$).

No que se refere à estrutura genética da escala local (Goiana) foram observados dois grupos: a) No primeiro estão as populações de *S. mansoni* das localidades Carne de Vaca e

São Lourenço. Estas duas populações apresentam em média a menor diversidade genética em comparação com o restante das populações e os valores menores foram identificados na população de São Lourenço (Tabela 8). Além disso, observou-se tanto um número menor de *loci* como uma percentagem menor de *loci* polimórfico em comparação com as outras populações (Tabela 8); b) No segundo grupo estão as populações de Ponta de Pedra e Impoeira. Estas apresentam em média uma maior diversidade genética. Nestas populações se identificou um maior número de *loci* e uma maior percentagem de *loci* polimórfico. No dendograma da distância genética (Figura 12) identificaram-se dois clados, o primeiro se encontra nas populações de Carne de Vaca e São Lourenço e o segundo está nas populações de Ponta de Pedras e Impoeira. Em relação à distância genética de Nei's (1978), o menor valor foi 0,00729 (entre Ponta de Pedra/Impoeira) e o valor mais alto foi 0,2165 (entre São Lourenço/Impoeira) (Tabela 9). Estes resultados corroboram a ausência de consistência encontrada entre o dendograma da distância genética e da distância geográfica e com a ausência de correlação encontrada através do teste de Mantel (Figuras 12 e 13).

Tabela 8. Variabilidade genética dos *loci* RAPD-PCR das quatro populações de *S. mansoni* presentes no município de Goiana, Estado de Pernambuco.

Variáveis		Carne de Vaca	São Lourenço	Ponta de Pedra	Impoeira	Total
Na	Média	1,45	1,21	1,67	1,73	1,94
	St. Dev	0,51	0,42	0,48	0,45	0,24
NE	Média	1,30	1,09	1,39	1,36	1,41
	St. Dev	0,41	0,21	0,36	0,34	0,33
H	Média	0,17	0,06	0,23	0,22	0,25
	St. Dev	0,21	0,13	0,19	0,19	0,17
Nº <i>loci</i>		15,00	7,00	22,00	24,00	31,00
% <i>loci</i> polimórfico		45,45	21,21	66,67	72,73	93,94

Nota: **na** = Número de alelos observado; **ne** = Média do número efetivo de alelos [Kimura e Crow (1964)]; **h** = Nei's (1973) diversidade genética; **P** = Número de *loci* polimórficos; **P%** = Percentagem de *loci* polimórficos; St. Dev= Desvio Padrão.

Tabela 9. Distância genética (cor cinza) e distância geográfica das quatro populações de *Schistosoma mansoni* presentes no município de Goiana, Estado de Pernambuco.

Localidades	Carne de Vaca	São Lourenço	Ponta de Pedra	Impoeira
Carne de Vaca	****	2,00	5,50	18,30
São Lourenço	0,0860	****	5,80	21,70
Ponta de Pedra	0,1070	0,1920	****	16,70
Impoeira	0,0873	0,2165	0,0729	****

Nota: A distância geográfica foi determinada em Quilômetro.

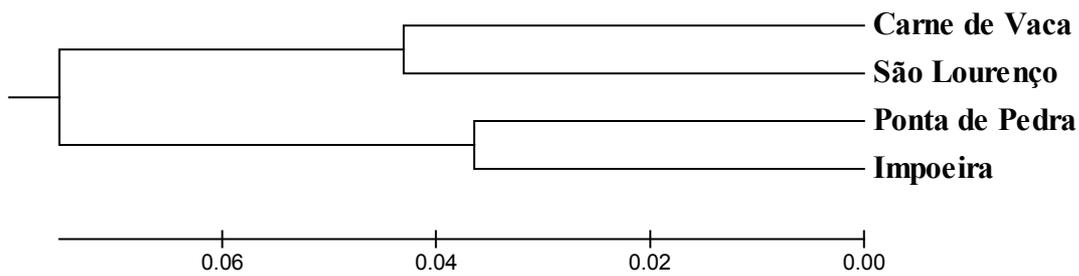


Figura 12. UPGMA Dendrograma de Nei's (1978) mostrando a distância genética entre as quatro populações de *S. mansoni* presentes no município de Goiana, Estado de Pernambuco.

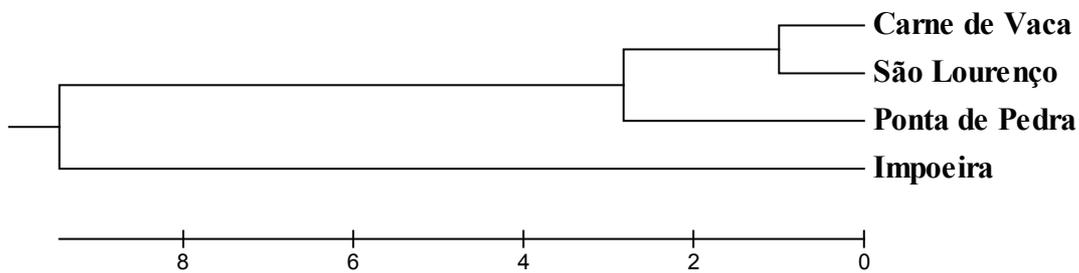


Figura 13. UPGMA Dendrograma da distância geográfica (em Km) nas quatro populações de *S. mansoni* presentes no município de Goiana, Estado de Pernambuco.

Em relação ao critério proposto por Wright (1978) para interpretar os valores de F_{ST} , tal como já foi explicado acima, na escala regional foi visto que este parâmetro na escala local, evidenciou a existência de uma grande diferenciação genética (média de G_{ST} ou $F_{ST}= 0,3253$) entre os locos analisados pelos *primers* OP-B6 e OP-G13 presentes nas quatro populações das localidades do município de Goiana (Apêndice I).

Por outro lado, quando analisamos a taxa de migração (Nm), o resultado obtido de $Nm= 1,036$ indica que deve existir uma leve diferenciação entre as populações analisadas (BOERGER et al., 1993). Em acréscimo, as populações que se diferenciam entre elas são: Carne de Vaca e Ponta de Pedras (distância genética = 0,107), São Lourenço e Ponta de Pedras (distância genética = 0,192), e São Lourenço e Impoeira (distância genética = 0,2165) (Tabela 9).

5.4.3 Análise da distribuição geográfica dos perfis genéticos identificados nas populações de *S. mansoni* através do RAPD-PCR, nos municípios selecionados para o estudo (escala regional e local).

O método *Median Joining Network (MJN)* foi usado para analisar a distribuição geográfica dos perfis genéticos identificados pelos *primers* OP-A9, OP-B6 e OP-G13, nas populações de *S. mansoni* tanto na escala regional como local. Com base na teoria de “*Coalescência*” (MORRISON, 2005), as análises realizadas com ajuda do *primers* OP-A9, apontam para o perfil cinco (P05) como o haplótipo mais frequente e que possui mais conexão com alguns dos perfis identificados nos municípios selecionados no Estado de Pernambuco. Entre os perfis que apresentaram uma frequência importante na escala regional, estão: P22, P01, P03, P11, P19 e P16 (Figura 14). Porém, os perfis que mostraram uma melhor representação geográfica foram: P01, P03, P11, P19 e P16, P14, P09 e P21 (Figura 14). Além disso, observaram-se alguns perfis isolados geograficamente: P04, P06, P07, P08, P12, P13, P18, P20, P22, P23 e P25. Em relação à escala local, observou-se que os perfis mantêm mais ou menos o mesmo comportamento quanto à frequência e representatividade geográfica. Além disso, foram identificados como isolados do ponto de vista geográfico os perfis: P08, P13, P18 e P23 (Figura 15).

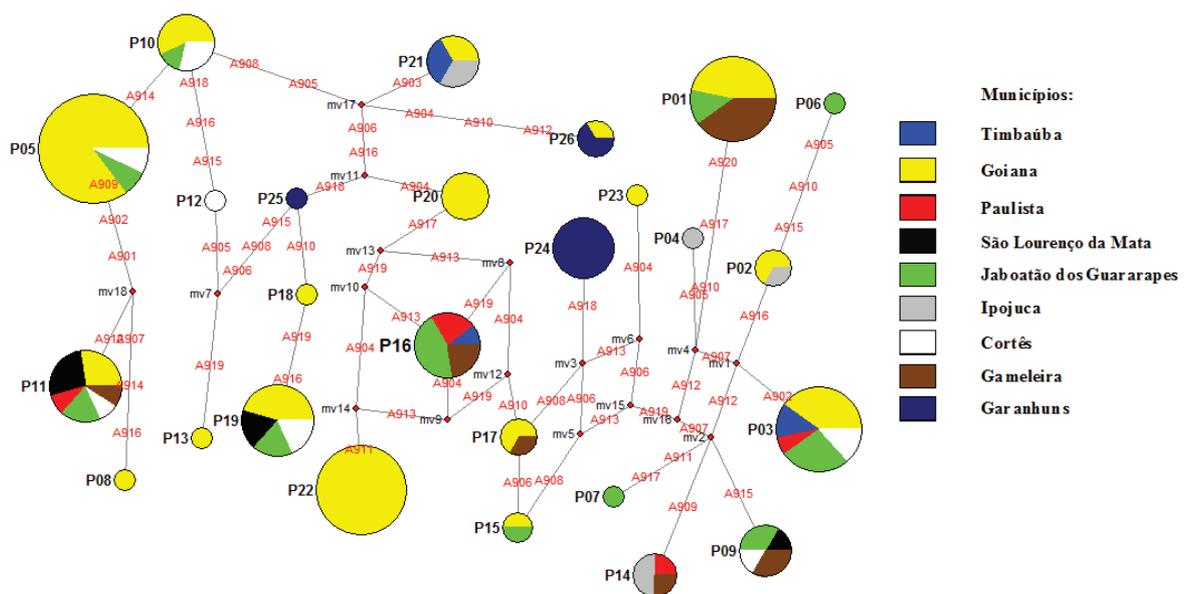


Figura 14. Distribuição geográfica dos 26 perfis genéticos identificados pelo *primer* OP-A9 das populações de *S. mansoni* em nove municípios do Estado de Pernambuco.

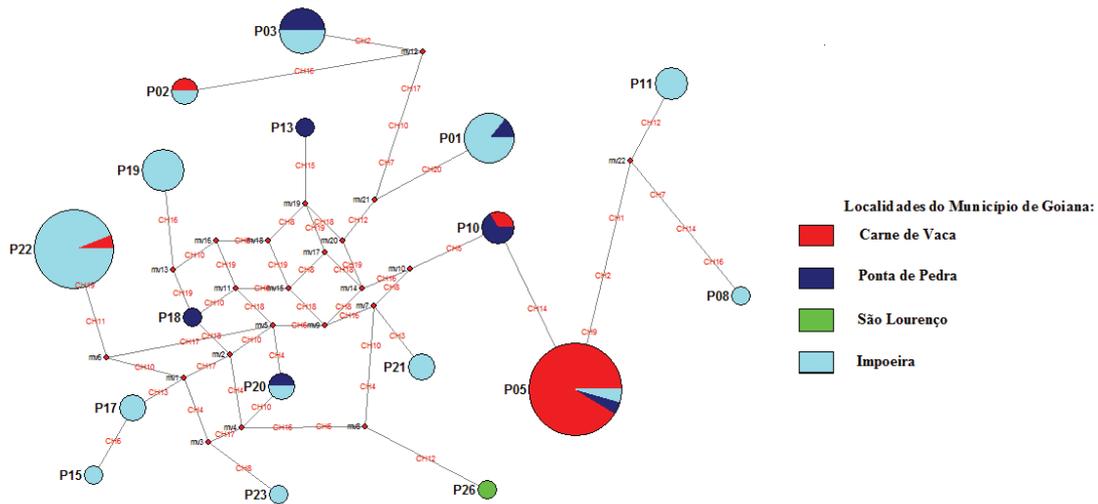


Figura 15. Distribuição geográfica dos 17 perfis genéticos identificados pelo *primer* OP-A9 das populações de *S. mansoni* em nove municípios do Estado de Pernambuco.

Com relação aos resultados obtidos pelo *primer* OP-B6, através do *MJN* identificou-se como haplótipo representativo na escala geográfica (regional) o perfil dezenove (P19), por estar em concordância com a teoria de “*Coalescência*” (MORRISOM, 2005). Os perfis que se apresentaram como os mais frequentes foram: P01, P02, P13, P22. Os que mostraram uma maior distribuição geográfica foram: P01, P02, P03, P04, P05, P06, P11, P13 e P18. Os perfis que se mostram isolados do ponto de vista geográfico foram: P09, P10, P12, P14, P15, P20 e P21 (Figura 16).

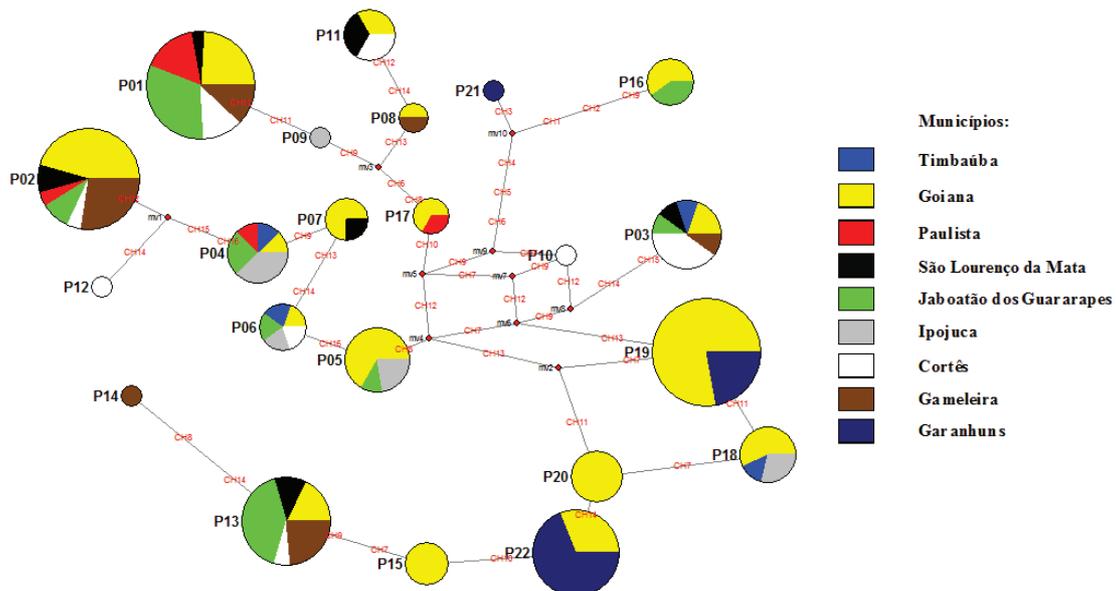


Figura 16. Distribuição geográfica dos 22 perfis genéticos identificados pelo *primer* OP-B6 das populações de *S. mansoni* em nove municípios do Estado de Pernambuco.

No que tange a escala local, os resultados do *MJN* através dos perfis identificados pelo *primer* OP-B6, mostram os mesmos padrões para os perfis que se apresentaram como mais frequente na escala regional (Figura 16). Mas, no que se refere aos perfis que se apresentam menos frequentes nesta escala, observou-se que alguns deles também estão presentes em outros municípios: P04, P05, P06, P08, P11, P16 e P22 (Figura 16 e 17).

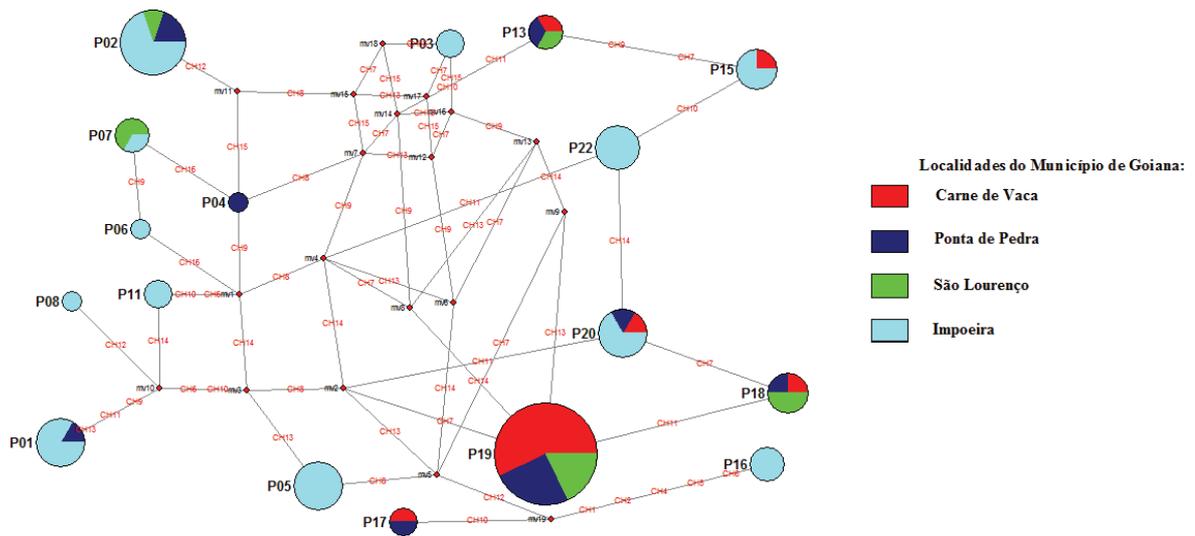


Figura 17. Distribuição geográfica dos 17 perfis genéticos identificados pelo *primer* OP-B6 das populações de *S. mansoni* em quatro localidades do município de Goiana, Estado de Pernambuco.

Quanto aos resultados obtidos pelo *primer* OP-G13, identificou-se através do *MJN* o perfil dez (P10) como haplótipo melhor representado na escala geográfica regional, por estar em conformidade com os critérios definidos anteriormente (MORRINSON, 2005). Nesta escala os perfis mais frequentes foram: P01, P09, P14, P15. A maior parte destes perfis tem uma boa distribuição geográfica: P01, P09, P10 e P14 (Figura 18). Alguns perfis se mostraram pouco frequentes e isolados do ponto de vista geográfico: P04, P05, P08 e P13 (Figura 19). Na escala local observou-se o mesmo padrão quanto à frequência dos perfis: P04, P05, e P08.

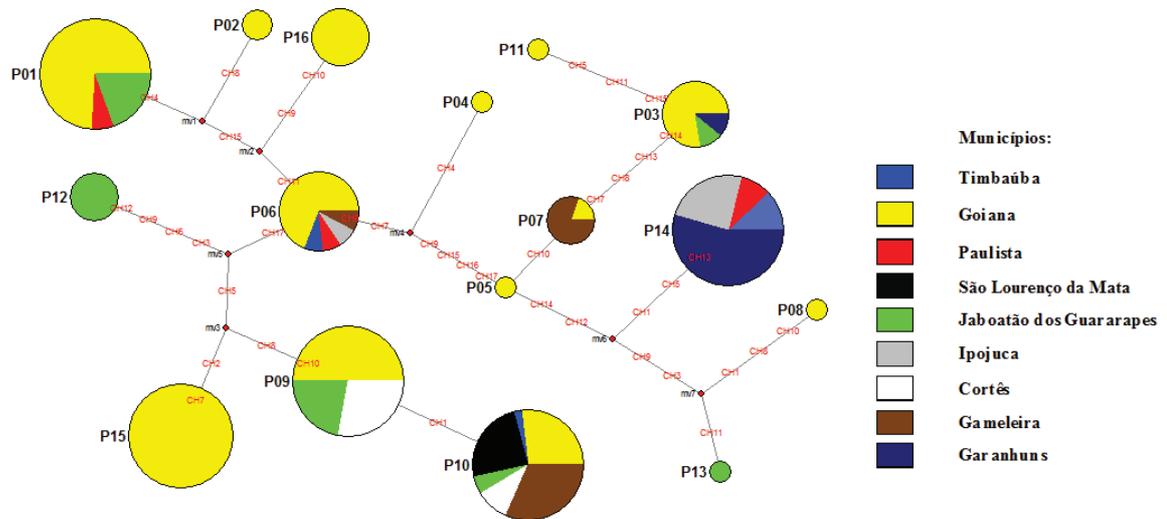


Figura 18. Distribuição geográfica dos 16 perfis genéticos identificados pelo *primer* OP-G13 das populações de *S. mansoni* em nove municípios do Estado de Pernambuco.

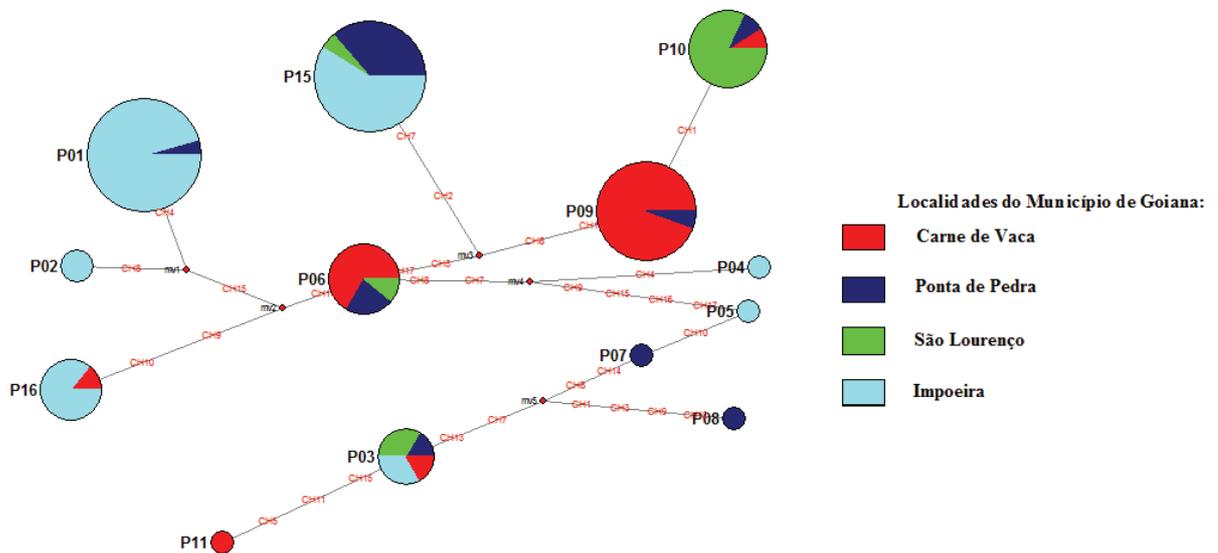


Figura 19. Distribuição geográfica dos 13 perfis genéticos identificados pelo *primer* OP-G13 das populações de *S. mansoni* em quatro localidades do município de Goiana, Pernambuco.

5.5 DISCUSSÃO

5.5.1 Identificação do polimorfismo genéticos das populações de *S. mansoni* presentes nos municípios selecionados

Neste trabalho, o uso da técnica RAPD-PCR para estudar o polimorfismo genético de vermes adultos coletados nas nove populações de *S. mansoni*, no Estado de Pernambuco, permitiu indicar a existência de uma diversidade genética importante. Assim, ao comparar os resultados obtidos através dos *primers* (OP-A9, OP-A10 e OP-G13) usados nesta pesquisa com os resultados reportados nos trabalhos de Sire et al. (1999; 2001), encontrou-se que o total de bandas e o número de *loci* polimórficos nas populações de *S. mansoni* analisadas aqui foram maiores. Uma possível explicação deste fato pode estar relacionada com as dimensões da área geográfica e o nível de heterogeneidade. As análises de Sire et al. (1999; 2001), desenvolvidas na Ilha Grande Terre (Colônia Francesa), em uma área geográfica bem menor, incriminaram *B. glabrata* como hospedeiro intermediário e na dinâmica da transmissão participaram dois hospedeiros definitivos (Homem e *Rattus ratus*). A presente pesquisa foi desenvolvida em área endêmica continental bem maior onde *B. glabrata* e *B. straminea* são os responsáveis pela dinâmica da transmissão da esquistossomose.

Nossos achados estão em concordância com os resultados dos trabalhos de Agola et al. (2009), Minchella et al. (1995), e Sire et al. (1999; 2001), os quais mostraram que os hospedeiros intermediários são responsáveis tanto pelos tipos como pelos níveis de dispersão dos genótipos do parasito nas áreas de estudo, já que o *Biomphalaria* poderia estar eliminando vários genótipos na fase de cercárias, como consequência de uma infecção plurimiracidial.

Neste sentido, na escala local observou-se diferenças nos níveis de susceptibilidade do *Biomphalaria* e, da infectividade e virulência do *S. mansoni* (ver Figuras 6 e 7). Com relação ao parasito, nossos achados mostram que na escala local estão circulando vários tipos de perfis genéticos. Alguns destes mostram relação com a presença do tipo de espécie do *Biomphalaria* (ver Apêndices 15, 17 e 19). No caso da escala regional, evidenciou-se que as áreas analisadas em Pernambuco que mostraram maior abundância relativa do *Biomphalaria* (*B. glabrata* e *B. straminea*) e das taxas de infecção natural destas espécies (ver a Tabela 1 e Quadro 1), são as áreas que apresentaram tanto um maior N° de *loci* como % de *loci* polimórfico (ver Tabela 6). Em acréscimo, os resultados de nosso trabalho estão em

concordância com Huyse et al. (2005), já que também existem outros fatores biológicos e ecológicos embutidos na interação parasito-vetor-vertebrados, os quais podem ter influência na distribuição dos perfis genéticos dentro e entre as populações de *S. mansoni*. No caso do município de Goiana-PE, foi possível evidenciar que os fatores ambientais (pluviometria, período climático e temperatura) e a heterogeneidade da eco-epidemiologia na dinâmica de transmissão específica de cada foco (ver Gráficos 1, 2, 3, 4, 5, e 6) são fatores que poderiam estar selecionando a circulação dos perfis genéticos das populações de *S. mansoni* (AGOLA et al. 2009; CURTIS; MINCHELLA, 2000; THIELE et al., 2008).

5.5.2 Análise da estrutura genética das populações de *S. mansoni* presentes nos municípios selecionados

A estrutura genética das populações de *S. mansoni* depende da interação das forças microevolutivas (CURTIS; MINCHELLA, 2000). Assim, as mutações criam novos alelos nas sub-populações. A seleção favorece ou aumenta a frequência de alguns tipos de alelos, e a alternância da frequência alélica é devida às flutuações dos processos estocásticos. Desta forma, cada uma destas forças faz que as populações sejam menos semelhantes. Mas, o fluxo gênico ou movimento de gametas ou migração dos indivíduos tendem a eliminar os limites entre as sub-populações. Em acréscimo, em algumas circunstâncias o fluxo genético se define como uma força evolutiva criativa, porque possibilita a distribuição dos alelos dentro e entre as populações. Não obstante, em outros momentos pode prever o surgimento de diferenças entre as populações (CURTIS; MINCHELLA, 2000; HEDRICK, 2000). No caso das populações de *S. mansoni* de Pernambuco, nossos dados mostram que a estrutura genética deste parasito, está sendo definida tanto pela forças microevolutivas indicadas como pela pressão de seleção exercida pelo *Biomphalaria* e também pelo grau de agregação e a distribuição geográfica desta espécie (CURTIS et al., 2002; JARNE; THERON, 2001; THIELE et al., 2008).

Por outro lado, uma possível interpretação sobre a comparação dos resultados obtidos por Sire et al. (1999; 2001), e os desta pesquisa, pode ser feita através do fluxo gênico e a taxa de migração observada em cada caso. Este fluxo pode ser interpretado através do modelo teórico de Ilha, onde o movimento de alelos se dá ao acaso, em qualquer direção, entre um grupo de pequenas populações (PERECIN, 2000). As observações relacionadas ao Estado

Pernambuco que dizem respeito da estrutura genética das populações *S. mansoni*, podem ser corroboradas pelo modelo visto acima, no qual é possível aplicar as seguintes premissas: a) as populações de maior tamanho mostram uma maior diversidade genética; b) as populações mais próximas têm um alto fluxo genético, tendem a ser mais semelhantes e em consequência a distância genética entre elas é pequena; c) as populações mais isoladas geograficamente apresentam uma menor diversidade e uma maior distância genética; d) as populações não funcionam como um sistema fechado, pelo contrário, tende a se interconectar através do fluxo genético. Estas características estão fortemente vinculadas com os modos de transmissão, os ciclos de vida dos parasitas e dos hospedeiros, e com a estrutura genética dos hospedeiros (BLOUIN et al., 1995).

Os achados deste trabalho mostram que as populações de *S. mansoni* que apresentam uma distância genética menor e ocupam o mesmo subclado, como nos municípios de São Lourenço da Mata, Cortês e Gameleira, estão compartilhando a mesma espécie de vetor, *B. straminea*. Um segundo subclado, formado por Goiana, Paulista e Jaboatão dos Guararapes, o vetor em comum e mais susceptível foi *B. glabrata*, embora em Goiana e Paulista também esteja presente *B. straminea*. Já no terceiro clado estão as populações dos municípios Timbaúba, Ipojuca e Garanhuns, sendo que este último apresenta as duas espécies do gênero *Biomphalaria*. Neste caso, é interessante destacar que apesar de que estejam no mesmo clado a população de *S. mansoni* de Garanhuns, está se comportando como um grupo independente. Timbaúba apresenta *B. straminea* enquanto apenas *B. glabrata* foi identificado nas localidades litorâneas de Ipojuca. Neste terceiro clado, apesar das populações de *S. mansoni* estarem distantes geograficamente, elas apresentam pequena distância genética. Além da presença do vetor, o fluxo genético parece ser outro fator determinante na proximidade destas populações, principalmente nas localidades do município de Ipojuca (ponto geográfico em comum) onde o desenvolvimento turístico promove alta rotatividade humana.

No que se refere à diferenciação genética (F_{ST}) e ao fluxo gênico (Nm) entre as populações analisadas tanto na escala regional como na escala local, os locos RAPD analisados nas duas escalas mostraram que existe uma diferenciação genética (escala regional $F_{ST} = 0,299$ e escala local $F_{ST} = 0,325$). Porém, quando se analisou as taxas de migração entre as populações (Nm) observamos que os valores encontrados foram maiores que 1 nas duas escalas (escala regional $Nm = 1,169$ e escala local $Nm = 1,0236$), o que indica que há uma pequena diferenciação genética entre as populações (BOEGER et al., 1993) por causa do alto fluxo gênico entre estas.

Os resultados das análises de Mantel (1967) mostraram uma correlação positiva e significativa colocando em evidência a existência de um padrão de dispersão geográfico sobre a distribuição da frequência alélica (LOUZADA et al., 2006). Este resultado está em concordância com o início da diferenciação genética entre as populações em função da distância geográfica, ou seja, populações mais próximas tenderão a ser mais semelhantes e no caso das mais distantes são mais diferentes.

Na escala local representada pelo município de Goiana, os resultados obtidos através do teste de Mantel (1967) não mostraram a existência de correlação. Este achado indica a presença de alto fluxo genético entre as populações deste município. Esta informação está em concordância com os resultados observados por Sire et al. (2001) e Gandon et al. (1996) também em escala local.

Em Pernambuco, embora as populações de *S. mansoni* mostrem uma pequena diferenciação genética por causa do fluxo genético, este processo é determinado principalmente pelos níveis de compatibilidades e de agregação ou de distribuição do *Biomphalaria* incriminado na transmissão. Mas, no tempo e no espaço esta situação poderia mudar, já que alguns locos mostraram valores de F_{ST} acima de 0,3 (indicando uma alta diferenciação genética) e valores de $Nm < 1$ (ausência ou baixo fluxo genético), o que poderia indicar que algumas sub-populações estão passando por um processo de diferenciação, como consequência da baixa interação com outras populações. Não obstante, será importante analisar um número maior de sub-populações de parasitos, além de usar marcadores genéticos mais robustos como o caso dos microssatélites, para poder definir esta situação.

5.5.3 Análise da distribuição geográfica dos perfis genéticos das populações de *S. mansoni* nos municípios selecionados

O método *Median Joining Network (MJN)* permitiu uma visão da distribuição e da biogeografia evolutiva das populações de *S. mansoni*, através da verificação da teoria de “*Coalescência*” e definição dos perfis (conjunto de alelos) como unidade evolutiva. Desta forma, identificou-se para cada *primer* um haplótipo representativo. É interessante notar que para cada um dos casos analisados este haplótipo sempre esteve sob um processo de seleção, já que precisou passar através das duas espécies de vetores do gênero *Biomphalaria*. Esta situação pode ser estimada a partir de nossos achados ecológicos, já que em alguns áreas

geográficas as duas espécies do gênero *Biomphalaria* estão compartilhando o mesmo habitat e estão participando na transmissão. Além disso, os vermes adultos isolados e analisados são de pessoas que frequentaram estes focos. Em acréscimo, o modelo *MJN* corrobora que o processo de segregação ou diferenciação, mutação, recombinação e hibridação, pelo qual passaram os haplótipos representativos de *S. mansoni* que provavelmente estavam ou continuam sendo direcionados tanto por *B. glabrata* como *B. straminea*.

Para aprofundar a interpretação do modelo *MJN* e explicar como é mantida variabilidade da estrutura geográfica e os processos evolutivos embutidos na escala regional, utilizou-se os modelos teóricos “*Red Queen* e *Custo-Benefício Trade-Offs*” para a explicação dos processos coevolutivos (*S. mansoni* - *Biomphalaria*) evidenciados em Pernambuco. O primeiro modelo teórico coevolutivo sugere que os perfis mais comuns são selecionados por ter um melhor valor reprodutivo (*fitness*) apresentando vantagem evolutiva. A *Frequência-Dependência* dos genótipos estará em dependência das condições favoráveis, estabelecendo um processo de adaptação local que pode ser definido como uma relação simpátrica. Neste sentido, este modelo teórico satisfaz parte da interpretação do modelo *MJN*, porque em Pernambuco evidenciou-se que a interação parasito-molusco mais eficiente é alopátrica. Desta forma, a aplicação do modelo “*Custo-benefício Trade-Offs*” tem um papel complementar na interpretação do *MJN*. Em acréscimo, a palavra “*Trade-Offs*” implica perder uma qualidade ou aspecto, ganhando em troca outra qualidade ou aspecto (WEBSTER; DAVIES, 2001; WEBSTER et al., 2004). Desta forma, é possível compreender as flutuações das variações genéticas para a resistência, infectividade e virulência dentro das populações naturais dos parasitas. No caso da escala local, como já foi dito a *Frequência-Dependência* dos perfis que estão circulando nesta escala, são regulados pelos níveis de compatibilidade da interação parasito-molusco. Por exemplo, na localidade de Impoeira, os moluscos mostraram um nível de susceptibilidade maior sendo factível deduzir que o número de perfis genéticos que circulam nesta área sejam maiores. No caso de Carne de Vaca, a cepa de molusco mostrou um nível de susceptibilidade menor sendo possível pensar que a pressão de seleção exercida pelos moluscos seja maior e, como consequência, o número de perfis genéticos dos parasitas selecionados e que circulam dentro das populações dos moluscos também seja menor.

Com relação à condição alopátrica, de acordo com Morand et al. (1996), poucas vezes este tipo de relação é mais eficiente que a relação simpátrica, já que esta última mostra a existência de uma maior compatibilidade na interação parasita - molusco e permite explicar o processo de adaptação local e de especiação. Neste sentido, os modelos teóricos realizados por Morand et al. (1996), a partir dos dados coletados no campo, mostram como único

exemplo de relação alopátrica a interação *S. mansoni*-*B. tenagophila*, e a explicação que foi colocada para explicar esta interação foi a introdução recente deste molusco na América do Sul.

Do ponto de vista da biogeografia evolutiva, a interação alopátrica identificada em Pernambuco é de data recente e pode ser atribuída às hipóteses que explicam a origem evolutiva tanto do *Biomphalaria* como do *Schistosoma*. A origem do *Biomphalaria* remete ao Gondwanaland, há 100 milhões de anos atrás (DAVIS 1980; 1992). Dentro deste contexto, as hipóteses recentes de Woodruff e Mulvey (1997) e de Campbell et al. (2000) explicam a origem e o processo de diversificação do *Biomphalaria* nos continentes Americano e Africano. Dentro deste cenário, foi proposto que o *Biomphalaria* ancestral do Neotropico é semelhante ao *Biomphalaria* Africano (DEJONG et al., 2001).

Uma hipótese baseada em evidências moleculares explica a origem do gênero *Schistosoma* em concordância com a hipótese apresentada sobre a origem dos *Biomphalaria*, foi proposta por Snyder e Loker (2000). Nesta hipótese sugere-se que a origem do *Schistosoma* ancestral é Asiático, e o processo de especiação e radiação adaptativa do parasita esteve acompanhado dos processos de especiação do *Biomphalaria*. A introdução do *S. mansoni* no Novo Mundo seria recente, entre o século XVI e XIX, através da comercialização dos escravos africanos (FILES; CRAM 1949).

No contexto epidemiológico, a interpretação do *MJN* com algoritmos gerados tanto para a escala regional como para a local, mostra que a transmissão dos perfis genéticos está condicionada à heterogeneidade e, dependência com a conectividade dos focos. A escolha do município de Goiana como escala local, permitiu colocar em evidência a contribuição dos fatores biológicos, genéticos, ecológicos e epidemiológicos na definição da transmissão da esquistossomose nestas escalas.

6 CONCLUSÕES

- a) A nova distribuição geográfica dos moluscos *Biomphalaria* detectados em áreas indenes indica três aspectos importantes do ponto de vista eco-epidemiológico: 1) os diferentes níveis de susceptibilidade apresentados pelas duas espécies vetoras podem estar contribuindo de forma independente para a criação de novos focos ou, de forma conjunta, na manutenção de um mesmo foco trazendo perspectivas de mudanças na paisagem epidemiológica; 2) Os três casos observados sobre a relação inter-específicas do *Biomphalaria* durante as atividades de campo, permitiram levantar a hipótese de segregação de nicho, embora, seja necessário revisar este assunto com maior cuidado, devido a implicação na definição das estratégias de controle da transmissão; e 3) Nossos achados apontam para dificuldades na implementação de estratégias de controle ambiental dos vetores diante da heterogeneidade dos habitats encontrados, reforçando a necessidade de um controle integrado adaptado para cada área.
- b) O uso dos modelos multivariados (ACC) permitiu melhorar a compreensão sobre o tipo de relação interespecífica existente entre os *Biomphalaria*, já que, permitiu colocar em evidência a existência de uma separação ecológica. Além disso, os achados deste trabalho permitem dizer que, em condições naturais é pouco provável validar a hipótese de que *B. straminea* é um bom competidor.
- c) Ficou evidenciado a importância da incorporação Nested-PCR nas atividades de rotina por parte dos Programas de Controle, já que o uso desta ferramenta permitirá definir estratégias mais eficazes na detecção dos focos que mostram uma dinâmica de transmissão pouco regular, como no caso dos focos mantidos por *B. straminea*.
- d) A interação parasita-molusco mais eficiente em Pernambuco é alopatrica, isto explica tanto a variabilidade da virulência e o poder de infecção observado sobre as cepas de *S. mansoni* como os diferentes níveis de susceptibilidade do *Biomphalaria*.
- e) Evidenciamos que as populações de *S. mansoni* analisadas exibem um alto polimorfismo genético através dos locos RAPD (OP-A9; OP-A10; OP-A11; OP-B6; e

OP-G13). Embora, os maiores polimorfismos foram identificados nas populações de *S. mansoni* de Goiana, Jaboatão do Guararapes e Paulista. Além disso, estas áreas geográficas exibem uma dinâmica de transmissão durante quase todo o ano, populações de *B. glabrata* altamente susceptíveis e, uma constante rotatividade das populações humanas como consequência do desenvolvimento turístico.

- f) Evidenciamos que as populações de *S. mansoni* analisadas mostram uma pequena diferenciação genética *S. mansoni* ao incorporar dentro das análises o parâmetro taxa de migração entre as populações (Nm). Esta diferenciação se observa principalmente entre as populações mais distantes do ponto de vista geográfico.
- g) Os perfis genéticos mais frequentes se encontram nos municípios que apresentam as duas espécies do gênero *Biomphalaria* incriminadas na transmissão. Dentro de uma perspectiva evolutiva, isto indica que a estrutura genética dos perfis de *S. mansoni* sempre esteve direcionada pela pressão de seleção exercida pelas duas espécies de *Biomphalaria*.

Em síntese podemos concluir que:

O caráter focal da transmissão da esquistossomose no Estado de Pernambuco é regulado pelos níveis de compatibilidades da interação parasita-molusco e das características ambientais (fatores bióticos e abióticos) específicas para cada foco.

A estrutura dos perfis genéticos que se evidencia em Pernambuco é definida por uma relação alopátrica, já que para os moluscos tem custo menor selecionar e manter a circulação de alguns perfis genéticos em várias áreas geográficas, pelo fato de não comprometer sua sobrevivência.

O *Median Joining Networks* permitiu examinar dois modelos teóricos coevolutivos (*Red Queen* e *Custo-Beneficio Trade-Offs*), tanto na escala regional como local, sendo possível validar a seguinte hipótese: “A heterogeneidade da dinâmica de transmissão da esquistossomose em Pernambuco depende da conectividade geográfica e funcional dos focos, explica o padrão geográfico dos perfis genéticos de populações de *S. mansoni*, definindo o caráter focal da esquistossomose”. Além disso, na perspectiva do controle da doença, as áreas que estão mostrando um maior polimorfismo genético devem ser definidas como o ponto

principal para a intervenção e implementação de estratégias de controle, porque são as fontes de contaminação ou de maior interação dos hospedeiros definitivos (humanos).

REFERÊNCIAS

ABAHT, F. G. et al.. Single-tube nested PCR using immobilized internal primers. Bio Techniques, Natick, v. 33, p. 1210-1214, 2002.

ABATH, F. G.; et al..Falta o título do artigo. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 101, supl. 1, p. 145-148, 2006.

ADEMA, C. M.; LOKER, E. S. Specificity and immunobiology of larval digenean-snail associations. In. FRIED, B. L.; GRACZYK, T. (Ed.). Advances in Trematode Biology. New York: CRC, 1997. p. 230-263.

AGOLA, L. E. et al. Genetic diversity and population structure of *Schistosoma mansoni* within human infrapopulations in Mwea, central Kenya assessed by microsatellite markers. Acta Tropical, Amsterdam, v. 111, p. 219-225, 2009.

ALVAREZ, M. J. M.; DELGADO, V. Susceptibilidad de *Biomphalaria glabrata* a *Schistosoma mansoni* procedentes de Venezuela y Brasil. Revista Latinoamericana de Microbiología, Ciudad de México, v. 41, p. 145-147, 1999.

AMARISTA, M. Variations spatio-temporelles des mollusques d'importance médicale dans le lac de Valencia, Vénézuéla, et perspectives de contrôle biologique. 1997. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Montpellier, Francia, 1997.

AMARISTA, M. et al. Interspecific competition between freshwater snail of medical importance: a Venezuelan example. Académie des sciences. Paris Sciences de la Vie, Paris, v. 324, p. 143-148, 2001.

AMARISTA, M.; BARBOSA, C. S. Controle Integrado do molusco vetor. In: BARBOSA, C. S.; SOUZA, E. G. Manual prático para o controle e diagnóstico da esquistossomose. Recife: Ed. Universitaria da UFPE, 2009. cap. 5, p. 47-63.

AMARAL, R. S.; PORTO, M. A. S. Evolução e situação atual do controle da esquistossomose no Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Rio de Janeiro, v. 27, p. 73-90, 1994.

AMARAL, M. C. E. ; et al. Guia de campo para identificação de plantas aquáticas Editoro Holos. p. 452. 2008.

ANDRADE, Z. A.; SOUZA, S. S. Origen of *Biomphalaria glabrata* hemocytes. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 101, suppl. 1, p. 213-218, 2006.

ANDRADE DE SOUZA, M. A.; et al. Criadouros de *Biomphalaria*, temporários e permanentes, em Jaboatão dos Guararapes, PE. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Rio de Janeiro, v. 41, n. 3, p. 252-256, 2008.

ARAÚJO, N.; KATZ, N.; DIAS, E. P.; SOUZA C. P. Susceptibility to chemotherapeutic agents of strains of *Schistosoma mansoni* isolated from treated and untreated patients. Americans Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 29, n. 5, p. 890-894, 1980.

ARAÚJO, K. C.; et al. Análise espacial de focos de *Biomphalaria glabrata* e de casos humanos de esquistossomose mansônica em Porto de Galinhas, Pernambuco, Brasil, no ano 2000. Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v 23, n. 2, p. 409-417, 2007.

ARMÊNIO, U.; PINSETA, D. E.; SASSON, S. Introdução a Biologia. São Paulo: Anglo, 1991. p. 88-95.

AYRES, M.; et al. Bioestat 5. Aplicação estatística nas áreas ciências bio-médicas. Belém: Instituto Mamirauá, 2007. p. 324.

BANDEL, H. J.; FOSTER, P.; RÖHL A. Median-Joining Networks for inferring intraspecific phylogenies. Molecular Biology and Evolution, Oxford, v. 16, n. 1, p. 37-48, 1999.

BARBOSA, F. S.; OLIVIER, L. Studies on the snail vectors of bilharziasis mansoni in the North-Eastern Brazil. Bull World Health Organization, Geneva, v. 18, p. 895-908, 1958.

BARBOSA, F. S. Alguns aspectos das relações hospedeiro-parasito entre as fases larvárias do trematódeo *Schistosoma mansoni* e o molusco *Astralorbis glabratus*. Recife: Fundação Oswaldo Cruz, 1959. Publicação de circulação interna.

BARBOSA, F. S. Possible competitive displacement and evidence of hybridization between two Brazilian species of planorbid snails. Malacologia, Madrid, v. 14, p. 401-8, 1973.

Ecologia de Biomphalaria e Genética de Schistosoma mansoni

BARBOSA, F. S.; COSTA, D. P. P.; ARRUDA, F. New field observations on the competitive displacement between two species of planorbid snails inhabiting North-Eastern Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 76, p. 361-366, 1981.

BARBOSA, F. S.; COSTA, D. P. P.; ARRUDA, F. Competitive inter-actions between species of freshwater snails. I. Laboratory studies: Ib. Comparative studies of the dispersal and vagility capabilities of *Biomphalaria glabrata* and *B. straminea*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 79, p. 163-167, 1984.

BARBOSA, F. S. Competitive displacement of *Biomphalaria glabrata* by *B. straminea*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 82, p. 139-141, 1987.

BARBOSA, F. S.; BARBOSA, C. S. The bioecology of snail vectors for schistosomiasis in Brazil. Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 10, p. 200-209, 1994.

BARBOSA, F. S.; BARBOSA, C. S. Controle biológico dos moluscos transmissores da esquistossomose: A competição interespecífica *Biomphalaria glabrata* x *Biomphalaria straminea*. In: BARBOSA, F. S. (Org.). Tópicos em Malacologia Médica. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 1995. p. 221-238.

BARBOSA, C. S.; SILVA, C. B.; BARBOSA F. S. Esquistossomose em Pernambuco: reprodução e expansão da endemia. Revista de Saúde Pública, São Paulo, v. 6, p. 609-619, 1996.

BARBOSA, C. S. Padrão epidemiológico da esquistossomose em comunidade de pequenos produtores rurais de Pernambuco. Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 14, p. 129-138, 1998.

BARBOSA, C. S.; et al. Ecoepidemiology of urban schistosomiasis in Itamaracá Islands, Pernambuco, Brazil. Revista de Saúde Pública, São Paulo, v. 34, n. 4, p. 337-341, 2000a.

BARBOSA C. S.; PIERI O. S. Aspectos epidemiológicos e malacológicos da esquistossomose masônica na Ilha de Itamaracá, PE. Revista de Saúde Pública, São Paulo, v. 34, p. 33-41, 2000b.

BARBOSA, C. S.; et al. Epidemia de esquistossomose aguda na praia de Porto de Galinhas, Pernambuco. Caderno Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 17, p. 725-728, 2001.

BARBOSA, C. S.; et al. Spatial distribution of schistosomiasis on Itamaraca Island Pernambuco, Brasil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 99, supl. 1, p. 79-83, 2004.

BARBOSA, C. S.; et al. S. Assessment of schistosomiasis, through school surveys, in the Forest Zone of Pernambuco, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 101, supl. 1, p. 55-62, 2006.

BARBOSA C.S.; et al. Epidemiologia e controle da esquistossomose mansoni. In: CARVALHO O. S.; COELHO P. M. Z.; LENZI H. L. *Schistosoma mansoni*. Esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2008. cap 33, p. 967-1028.

BARBOSA, C. S.; et al. 2008. Expedição científica para investigação malacológica no litoral de Pernambuco. Disponível em: <<http://200.17.137.109:8081/xiscanoe/>> . Acesso em: 20 jan. 2010.

BARBOSA, C. S.; et al. Current epidemiological status of schistosomiasis in the state of Pernambuco, Brasil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 105, n. 4, 2010. No prelo.

BARRAL, V.; et al. Genetic variability and evolution of the *Schistosoma* genome analysed by using random amplified polymorphic DNA markers. Molecular and Biochemical Parasitology, New York, v. 59, p. 211-222, 1993.

BARRAL, V.; et al. Distribution of schistosome genetic diversity within naturally infected *Rattus rattus* detected by RAPD markers. Parasitology, New York, v. 113, p. 511-517, 1996.

BEZERRA DA SILVA, P.; et al. Aspectos físico-químicos e biológicos relacionados à ocorrência de *Biomphalaria glabrata* em focos litorâneos da esquistossomose em Pernambuco. Química Nova, Brazilian, p. 1-6, 2000.

BLOUIN, M. S.; et al. Host movement and the genetic structure of populations of parasitic nematodes. Genetics, New York, v 141, p. 1007-1014, 1995.

BOEGER, J. M.; CHEN, R. S.; McDONALD, B. A. Gene flow geographic populations of *Mycosphaerella graminicola* (Anamoeoph *Septoria tritici*) detected with restriction fragment length polymorphism markers. Genetics. New York, v. 83, n. 11, p. 1148-1154, 1993.

BRAAK, C. J. F. T. Canonical correspondence analysis: a new eigen vector technique for multivariate direct gradient analysis. Ecology, London, p. 1167-1179, 1986.

BRAAK, C. J. F. T.; SMILAUER, P. Software for canonical community ordination (Version 4). Ithaca: Microcomputer Power, 1998.

BRASIL.Ministerio da Saúde. Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica. Diretrizes técnicas: programa de vigilância e controle da esquistossomose (PCE). Brasília, DF, 2008.

BURLANDY-SOARES, L. C.; et al. *Schistosomiasis mansoni*: follow-up of control program based on parasitologic and serologic methods in a Brazilian community of low endemicity. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 98, n. 6, p. 190-199, 2003.

CALDEIRA, R. L.; JANNOTTI-PASSOS, L. K.; CARVALHO, O. S. Molecular epidemiology of Brazilian *Biomphalaria*: a review of the identification of species and the detection of infected snails. Acta Trópica, Amsterdam, v. 111, n. 1, p. 1-6, 2009.

CALLISTO, M.; et al. Malacological assessment and natural infestation of *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) by *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907) and *Chaetogaster limnaei* (K. von Baer, 1827) in an urban eutrophic watershed. Brazilian Journal of Biology, São Carlos, v. 65, n. 2, p. 217-228, 2005.

CAMPBELL, G.; et al. Molecular evidence supports an African affinity of the Neotropical freshwater gastropod, *Biomphalaria glabrata*, Say 1818, an intermediate host for *Schistosoma mansoni*. Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences, London, v. 267, p. 2351-2358, 2000.

CAMPOS, R.; et al. Hycanthon resistance in a human strain of *Schistosoma mansoni*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine Hygiene, London, v. 70, p. 261-262, 1976.

CARVALHO, O. S.; et al. Re-evaluation of *Schistosomiasis mansoni* in Minas Gerais - Brazil III. Noroeste de Minas mesoregion. Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo, v. 40, p. 277-279, 1998.

CARVALHO, O. S. ; KONOVALOFF, L. J. P. ; CALDEIRA, R. L. Importância epidemiologia e biologia molecular aplicada aos moluscos do gênero *Biomphalaria*. In: CARVALHO, O. S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. *Schistosoma mansoni*.

Esquistossomose: Uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz., 2008. cap. 9, p. 311-346.

CESARI, I. M.; ALARCÓN, N. B. Esquistosomiasis mansoni. Diagnóstico y control. Caracas: Centro de Estudios Avanzados I.V.I.C, 1987.

CHARLESWORTH, B.; MORGAN, M. T.; CHARLESWORTH, D. The effect of deleterious mutations on neutral molecular variation. Genetics, New York, v. 134, p. 1289-1303, 1993.

CHENG, T. The compatibility and incompatibility concept as related to trematodes and mollusks. Pacific Science, Honolulu, v. 22, p. 141-150, 1968.

CHIEFFI, P. P.; WALDMAN, E. A. Aspectos particulares do comportamento epidemiológico da esquistossomose mansônica no Estado de São Paulo. Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro. v. 4, n. 3, p. 257-275, 1988.

CHITSULO, L.; ENGELS, D.; MONTRESOR, A.; SAVIOLI, L. The global status of schistosomiasis and its control. Acta Tropical, Amsterdam, v. 77, p. 41-51, 2000.

CLARK, A. G.; LANINGAN, C. M. S. Prospects for estimating nucleotide divergence with RAPDs. Molecular Biology and Evolution, Oxford, v. 10, p. 1096-1111, 1993.

COELHO, M. V. O parasito: *Schistosoma mansoni*. In: CUNHA, A. S. 1 edição, São Paulo, Sarvier. 411. 1970

COLES, G. C.; et al. Drug resistance in schistosomiasis. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, London, v. 80, p. 347, 1986.

COMBES, C. Interactions durables. Ecologie et eovolution du parasitisme. Paris: Masson, 1995.

COURA, J. R.; AMARAL, R. S. Epidemiological and Control Aspects of Schistosomiasis in Brazilian Endemic Areas. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 99, supl. 1, p. 13-19, 2004.

COUTINHO, E. M.; et al. Factors involved in *S. mansoni* infection in rural areas in Northeast Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 92, p. 707- 715, 1997.

COUTINHO A. I. V.; et al. *Lutzomyia longipalpis* s. l. in Brazil and the impact of the São Francisco River in the speciation of this sand fly vector. Parasites & Vectors, Orlando, p. 1-11, 2008.

CURTIS, J.; MINCHELLA, D. J. Schistosome population genetic structure: when clumping worms is not just splitting hairs. Parasitology Today, Amsterdam, v. 16, p. 68-71, 2000.

CURTIS, J.; SORENSEN; MINCHELL, A. Schistosome genetic diversity: the implications of population structure as detected with microsatellite markers. Parasitology, New York, v. 125, p. 51-59. 2002.

DABO, A.; et al. Dispersion and genetic diversity of *Schistosoma hematobium* within its bulinid intermediate host in Mali. Acta Tropica, Amsterdam, v. 66, p. 15-26, 1997.

DAVIS, G. M. Snail hosts of Asian *Schistosoma* infecting man: evolution and coevolution. Malacological Review, Seattle, suppl. 2, p. 195-238, 1980.

DAVIS G.M. Evolution of prosobranch snails transmitting Asian *Schistosoma*; coevolution with *Schistosoma*: a review. Progress in Clinical Parasitology, New York, v. 3. p. 145-204. 1992.

DEJONG, R. J.; et al. Evolutionary relationships and biogeography of *Biomphalaria* (Gastropoda: Planorbidae) with implications regarding its role as host of the human bloodfluke, *Schistosoma mansoni*. Molecular Biology and Evolution, Oxford, v. 18, n. 12, p. 2225-2239, 2001.

DESPRÈS, L.; IMBERT-ESTABLET, D.; MONNEROT, M. Molecular characterization of mitochondrial-DNA provides evidence for the recent introduction of *Schistosoma mansoni* into America. Molecular and Biochemical Parasitology, Amsterdam, v. 60, p. 221-230, 1993.

DIAS, N. E.; et al. The random amplification of polymorphic DNA allows the identification of strains and species of schistosome. Molecular and Biochemical Parasitology, Amsterdam, v. 57, p. 83-88, 1993.

DILLON, R. T. Jr. The ecology of freshwater molluscs. Cambridge: Cambridge University Press, 2000.

DRESCHER, K. M.; et al. Response of drug resistant isolates of *Schistosoma mansoni*, to antischistosomal agents. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 88, p. 89-95, 1993.

DUMONT, M.; et al. Influence of pattern of exposure, parasite genetic diversity and sex on the degree of protection against reinfection with *Schistosoma mansoni*. Parasitology Research, New York, v. 101, p. 247-252, 2007.

DUVALL, R. H.; DEWITT, W. B. An improved perfusion technique for recovering adult schistosomes from laboratory animals. American Journal Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 16, p. 483-486, 1967.

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

FARIAS L.M.N.; et al. Análises preliminar do sistema de informação do Programa do Controle da Esquistossomose no período 1999 a 2003. Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 23, p. 235-239, 2007.

FAVRE, T.; et al. Cercarial Emergence of *Schistosoma mansoni* from *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria straminea*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, v. 90, n. 5, p. 565-567, 1995.

FAVRE, T.C. Impacto da quimioterapia com oxamniquine sobre a infecção por *Schistosoma mansoni* em duas localidades da Zona Litoral-Mata de Pernambuco. Dissertação (Doutorado), Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 1999.

FAVRE, T. ; et al. Avaliação das ações de controle da esquistossomose implementadas entre 1997 e 1996 na área endêmica de Pernambuco, Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Rio de Janeiro, v. 34, p. 569-576, 2001.

FAVRE, T.; et al. A longitudinal study on the natural infection of *Biomphalaria straminea* and *B. glabrata* by *Schistosoma mansoni* in an endemic area of schistosomiasis in Pernambuco, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 97, n. 4, p. 465-475, 2002.

FERNANDEZ, M.A., PIERI, O.S. Infection by *Schistosoma mansoni* Sabom 1907 in the first four months of life of *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) in Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 96, Suppl I, p. 185-192, 2001.

FERNANDEZ, M.A.; THIENGO S.C. Susceptibility of *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) from Serra da Mesa Dam, Goiás, Brazil to infection with three strains of *Schistosoma mansoni* Sabon, 1907. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, v. 97, supl. 1, p. 59-60, 2002.

FILES, V. S.; CRAM, E. B. A study of the comparative susceptibility of snail vectors of *Schistosoma mansoni*. Journal of Parasitology, Lawrence, v. 35, p. 555-560, 1949.

FLETCHER, M.; LoVERDE, P. T.; WOODRUFF, D. S. Genetic variation in *Schistosoma mansoni*: enzyme polymorphisms in populations from Africa, Southeast Asia, South America and West Indies. American Journal Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 30, p. 406-421, 1981.

FLUXUS TECHNOLOGY LTD. Software: Network 4.5.1.6. England, 2009.

FRIED, B.; GRACZYK, T. K. Advances in trematode biology. New York, CRC Press LLC, 1997.

ARVALHO, E. M. F.; et al. Evolução da esquistossomose na Zona da Mata Sul de Pernambuco. Epidemiologia e situação atual: controle ou descontrole?. Caderno da Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 14, n. 4, p. 787-795. 1998.

GANDON, S.; MICHALAKIS Y.; EBERT, D. Temporal variability and local adaptation. Trends in Ecology and Evolution, London, v. 11, p. 431, 1996.

GENTILE, R.; OLIVEIRA, G. Dispersion and genetic diversity of *Schistosoma hematobium* within its bulinid intermediate host in Mali. Acta Tropica, Amsterdam, v. 108, n. 2-3, p. 175-178, 2008.

GERARD, C.; MONE, H.; THERON, A. *Schistosoma mansoni* - *Biomphalaria glabrata*: dynamics of the sporocyst population in relation to the miracidial dose and the host size. Canadian Journal of Zoology - Revue Canadienne de Zoologie, Montreal, v. 71, p. 1880-1885, 1993.

GÉRARD, C.; THÉRON, A. Spatial interaction between parasite and host within the *Biomphalaria glabrata*/*Schistosoma mansoni* system: influence of host size at infection time. Parasite Diseases, New York, v. 2, p. 345-350, 1995.

GIOVANELLI, A.; VINICIUS, M. V.; PINTO, C. L. A. C. S. Apparent Competition Through Facilitation between *Melanoides tuberculata* and *Biomphalaria glabrata* and the Control of Schistosomiasis. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 98, n. 3, p. 429-431, 2003.

GRAY, I. C.; CAMPBELL D. A.; SPURR N. K. Single nucleotide polymorphisms as tools in human genetics. Human Molecular Genetics, Oxford, v. 16, p. 2403-2408, 2000.

GREVELDING, C. G.; KAMPKÖTTER, A.; KUNZ W. *Schistosoma mansoni*: Sexing cercariae by PCR without DNA extraction. Experimental Parasitology, San Diego, v. 85, p. 99-100, 1997.

GUIMÃRAES, C. T.; SOUZA, C. P.; SOARES, D. M. Possible competitive displacement of planorbis by *Melanoides tuberculata* in Minas Gerais, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 96, p. 173-176, 2001.

HAGELBERG, E.; GRAY, I. C.; JEFFREYS, A. J. Identification of the skeletal remains of a murder victim by DNA analysis. Nature, London, v. 352, p. 427-429, 1992.

HEDRICK, P. W. Genetics of populations. Jones & Bartlett Publ Inc, Sudbury, p. 553, 2000.

HERNANDEZ, D. C.; LIM, K.C.; MCKERROW, J. H.; DAVIES, S. J. *Schistosoma mansoni*: sex-specific modulation of parasite growth by host immune signals. Experimental Parasitology, San Diego, v. 106, p. 59-61, 2004.

HUSON, D. H. ; BRYANT, D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. Molecular Biology and Evolution, Oxford, v. 23, n. 2, p. 254-267, 2006.

HUYSE, T.; POULIN, R.; THÉRON, A. Speciation in parasites: a population genetics approach. Trends Parasitology, Oxford, v. 2, n. 10, p. 469-475, 2005.

JAMJOOM M. B. Molecular Identification of Some *Schistosoma mansoni* Isolates in Saudi Arabia. World Journal of Medical Sciences, Pakistan, v. 1, n. 2, p. 102-107, 2006

JARNE P.; THERON A. Genetic structure in natural populations of flukes and snails : a practical approach and review. Parasitology, New York, v. 123, p. 27-40, 2001.

KATZ N.; CHAVES A.; PELLEGRINO, J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 14, p. 397-400, 1972.

KATZ, N. An estimate of the number of carriers of *Schistosomiasis mansoni* in Brazil. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SCHISTOSOMIASIS, 7., 1999, Rio de Janeiro. Abstracts. Rio de Janeiro, 1999. p. 80.

KATZ, N.; PEIXOTO, S. V. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Rio de Janeiro, v. 33, p. 303-308, 2000.

KAUKAS, A et al. Phylogenetic analysis of *Schistosoma haematobium* group species based on randomly amplified polymorphic DNA. International Journal Parasitology, Oxford, v. 24, p. 285-290, 1994.

KLOOS, H.; et al. Distribution and *Schistosoma mansoni* infection of *Biomphalaria glabrata* in a rural area in the Jequitinhonha Valley, Minas Gerais Brazil: environmental and epidemiological aspects. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 99, p. 673-681, 2004.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. Mega 3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. Briefings in Bioinformatics, Oxford, v. 5, p. 150-163, 2004.

KUNTZ, E.R. Effect of light and temperature on shedding of *Schistosoma mansoni* cercariae. Naval Medicinal Research Intitute (U.S.), Bethesda, v. 7, p.16, 1946.

KUNZ, W. *Schistosome* male-female interaction: induction of germ-cell differentiation. Trends Parasitology, Oxford, v. 17, n. 5, p. 227-231, 2001.

LANCASTRE, F.; et al. Schistosomose experimental III. Observations sur l'infestation de *Biomphalaria glabrata* par un miracidium de *Schistosoma mansoni*. Annales de Parasitologie Humaine et Comparee. Paris, p. 79-94, 1984.

LANGAND, J.; et al. Population structure of *Biomphalaria glabrata*, intermediate host of *Schistosoma mansoni* in Guadalupe island, using RAPD markers. Journal of Molluscan Studies, v. 65, p. 425-433, 1999.

LENZI, H. L.; et al. Patologia experimental com enfoque no granuloma esquistossomótico. In: CARVALHO, O. S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. *Schistosoma mansoni*. Esquistossomose. Uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2008. cap 33, p. 571-654.

LoVERDE P. T.; et al. *Schistosoma mansoni* male-female interactions. Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie, Montreal, v. 82, n. 2, p. 357-374, 2004.

LOUREIRO S. A questão social na epidemiologia da esquistossomose mansônica. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 84, Suppl. I, p. 125-133, 1989.

LOUZADA, J. M.; BEARZOTI, E.; CARVALHO D. Avaliação e aplicação de testes para a detecção da autocorrelação espacial usando marcadores genético. Ciências agrotécnicas. Lavras. v. 30, p. 206-213, 2006.

MAGALHÃES, L. A.; DIAS, C. C. S. Estudo de suscetibilidade da *Biomphalaria glabrata* de Ourinhos (SP), à infecção pelo *Schistosoma mansoni* de Belo Horizonte (MG), e de São José dos Campos (SP). Revista de Saúde Pública, São Paulo, v. 7, p. 295-297, 1973.

MALEK, E. A.; CHENG, T. C. Medical and economic malacology. New York. Academic Press. 1974.

MALEK, E. A. Snail hosts of schistosomiasis and other snail-transmitted diseases in tropical America: a manual. Washington: Pan American Health Organization, 1985. (Scientific Publication. PAHO, n. 478).

MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Research. Birmingham, v. 27, n. 2, p. 209-202, 1967.

MARX, K. A.; et al. Experimental DNA melting behavior of the three major *Schistosoma* species. Molecular and Biochemical Parasitology. Amsterdam, v. 107. N. 2. P. 303-307. 2000.

MATRICON-GONDON, M., LETOCART, M. Internal Defenses of the Snail *Biomphalaria glabrata* I. Characterization of Hemocytes and Fixed Phagocytes. Journal of Invertebrate Pathology, Amsterdam, v. 74, p. 224–234, 1999.

McMANUS, D. P.; HOPE, M. Molecular variation in the human schistosomes. Acta Tropica, Amsterdam, v. 53, p. 255-276, 1993.

McCUTCHAN, T. F.; et al. Differentiation of Schistosomes by species, strain, and sex using cloned DNA markers. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, USA, v. 81, p. 889-893, 1984.

MELO, C. M. Análise da variação intra-específica em linhagens Brasileiras de *Schistosoma mansoni* (Sambom, 1907) através de RAPD-PCR e RAP-PCR. 2001. Dissertação (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

MELO, F. L. Desenvolvimento de métodos moleculares baseados em para a detecção de *Schistosoma mansoni*. Tese (Doutorado) - Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2006.

MELO, F. L.; et al. Development of molecular approaches for the identification of transmission sites of shistosomiasis. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, London, v. 100, p. 1049-1555, 2006.

MINCHELLA, D. J.; SOLLENBERGER, K. M.; SMITH, M. H. Distribution of schistosome genetic diversity within molluscan intermediate hosts. Parasitology, New York, v. 11, p. 217-220, 1995.

MICHELSON, E. H.; DUBOIS, L. Susceptibility of Bahian populations of *Biomphalaria glabrata* to allopatric strain of *Schistosoma mansoni*. America Juornal Tropical and Medicine Hygiene, Baltimore, v. 27. n . 4. p. 782-786. 1978.

MORAND, S.; MANNING, S. D.; WOOLHOUSE, M. E. J. Parasite-host coevolution and geographic patterns of parasite infectivity and host susceptibility. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, London, v. 263, p. 119-128, 1996.

MORAND, S.; MÜLLER-GRAF, C. D. M. Muscles or testes? Comparative evidence for sexual competition among dioecious blood parasites (Schistosomatidae) of vertebrates. Parasitology, New York, v. 120, p. 45-56, 2000.

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

MORGAN, J. A. T; DEJONG, R. J; ADEOYE, G. O; ANSA, E. D. O.; BARBOSA, C. S.; BREMOND, P.; CESARI, I. M; CHARBONNEL, N.; CORREA, L. R.; COULIBALY, G. Origin and diversification of the human parasite *Schistosoma mansoni*. Molecular Ecology, Loughborough, v. 14, p. 3889-3902, 2005.

MORRINSON, D. A. Networks in phylogenetic analysis: new tools for population biology. International Journal for Parasitology, Oxford, v. 35, p. 567-582, 2005.

MOSSMAN, C.A.; WASER P.M. Genetic detection of sex-biased dispersal. Molecular Ecology, Loughborough, v. 8, p. 1063–1067, 1999.

MULLIS, K. B., FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. Methods in Enzymology, New York, v. 155, p. 335-350, 1987.

NAVARRO, M. C.; CESARI, I. M.; INCANI, R. M. Isoenzyme studies in one Brazilian and two Venezuelan strains of *Schistosoma mansoni*. Compendius of Biochemistry and Physiology, New York, v. 102, b, p. 471-74, 1992.

NEI, M. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. Genetics, New York, v. 41, p. 225-233, 1977.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics, New York, v. 89, p. 583-590, 1978.

NIEMANN, G. M.; LEWIS, F. A. *Schistosoma mansoni* – influence of *Biomphalaria glabrata* size on susceptibility to infection and resultant cercarial production. Experimental Parasitology, New York, v.70, p. 286-292, 1990.

NEWTON, W. L. The inheritance of susceptibility to infection with *Schistosoma mansoni* in *Australorbis glabratus*. Experimental Parasitology, San Diego, v. 2, p. 242-257, 1953.

NORUŠIS, M. J, SPSS Statistics 17.0. Statistical Procedures Companion. Chicago: Prince hall, 2008.

OLIVEIRA, G. C.; ABATH, F. G. C.; FRANCO, G. R. Genômica e biologia molecular de *Schistosoma mansoni*. In: CARVALHO, O. S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. *Schistosoma mansoni*. Esquistossomose. Uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2008. cap 33, p. 571-654.

OLIVEIRA, A. A.; et al. Estudo da prevalência e fatores associados à fasciolose no Município de Canutama, Estado do Amazonas, Brasil. Epidemiologia Serviço e Saúde, Brasília, v. 16, n. 4, p. 251-259, 2007.

OLIVER, L.; SCHNEIDERMAN, M. A method for estimating the density of aquatic snail populations. Experimental Parasitology, San Diego, p. 109-117, 1956.

PARAENSE, W. L., CORRÊA, L. R. Susceptibility of *Biomphalaria peregrina* from Brazil and Ecuador to two strains of *Schistosoma mansoni*. Revista do Instituto de Medicina Tropical do São Paulo, São Paulo, v. 15, p. 127-130, 1973.

PARAENSE, W. L.; CORRÊA, L. R. A potencial vector of *Schistosoma mansoni* in Uruguay. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 84, p. 281-288, 1989.

PAREDES, H. Indicadores de risco para esquistossomose Mansoniana na localidade de Carne de Vaca, Goiana, Pernambuco: Análise do padrão espacial. 2008. Dissertação (Mestrado) - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2008.

PASSOS, A.D.C.; AMARAL, R.S. Esquistossomose mansônica; aspectos epidemiológicos e de controle. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Rio de Janeiro, v. 31, supl. 2, p. 61-74, 1998.

PASTEUR, N.; et al. Manuel de génétique par électrophorèse des protéines. Paris: Lavoisier, 1987. (Collection technique et documentation).

PELLEGRINO, J.; COELHO, P. M. Z. *Schistosoma mansoni*: wandering capacity of a worm couple. The Journal of Parasitology, cidade, v. 64, p. 181-182, 1978.

PERECIN, M.B. Diversidade genética em populações naturais de espécies de Espinheira-Santa, *Maytenus aquifolia* Mart. e *M. ilicifolia* Mart. ex Reiss. 2000. Tese (Doutorado) - Departamento de Genética, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

PESSÔA, S.B.; MARTINS, A.V. Parasitologia Médica. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988.

POINTIER, J. P.; GUYARD, A. Biological control of the snail intermediate hosts of *Schistosoma mansoni* in Martinique, French West Indies. Tropical Medicine and Parasitology, Baltimore, v. 43, p. 98-101, 1992.

POINTIER, J. P.; THÉRON, A.; BOREL, G. Ecology of the introduced snail *Melanoides tuberculata* (Gastropoda: Thiaridae) in relation to *Biomphalaria glabrata* in the marshy forest zone of Guadeloupe, French West Indies. Journal of Molluscan Studies, Oxford, v. 59, p. 421-428, 1993.

POINTIER, J. P.; et al. Invasion of the rivers of the littoral central region of Vénézuéla by *Thiara granifera* and *Melanoides tuberculata* (Mollusca: Prosobranchia: Thairidae) and the absence of *Biomphalaria glabrata*, snail host of *Schistosoma mansoni*. The Nautilus, Philadelphia, v. 107, p. 124-128, 1994.

POINTIER, J. P. Invading freshwater snails and biological control in Martinique Island, French West Indies. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 96, p. 67-74, 2001.

PRUGNOLLE, F.; DE MEEUS, T. Inferring sex-biased dispersal from population genetic tools: a review. Heredity, Washington D.C., v. 88, p. 161-165, 2002a.

PRUGNOLLE, F.; et al. Sex-specific genetic structure in *Schistosoma mansoni*: evolutionary and epidemiological implications. Molecular Ecology, Loughborough, v. 11. p. 1231-1238. 2002b.

PRUGNOLLE, F.; et al. Sex-specific genetic structure: new trends for dioecious parasites. Trends in Parasitology, Oxford, v. 19, n. 4, p. 171-174, 2003.

PRUGNOLLE F.; et al. Dispersal in a parasitic worm and its two hosts: consequence for local adaptation. Evolution, Oxford, v. 59, n. 2, p. 296–303, 2005.

PRUGNOLLE, F.; et al. Geographical variations in infectivity and susceptibility in the host-parasite system *Schistosoma mansoni*/*Biomphalaria glabrata*: no evidence for local adaptation. Parasitology, Cambridge University Press, v. 133, p. 313-319, 2006.

QUEIROZ, B. V. Variabilidade genética de marcadores RAPD-PCR e caracterização *in silico* de etiquetas de genes expressos (ESTs) de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). 2002. Tese (Doutorado) - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2002.

RAMOS, A. C. S.; et al. Phylogeography of the Tree *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae: Caesalpinioideae) and the Influence of Quaternary Climate Changes in the Brazilian Cerrado. Annals of Botany, Oxford, v. 100, p. 1219-1228, 2007.

REY, L. Parasitología. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

RICHARDS, C. S. Susceptibility of adult *Biomphalaria glabrata* to *Schistosoma mansoni* infection. American Journal Tropical and Medicine Hygiene, Baltimore, v. 21. p. 748-756. 1973.

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

ROLLINSON, D.; IMBERT-ESTABLET, D.; ROSS, G. C. *Schistosoma mansoni* from naturally infected *Rattus rattus* in Guadeloupe: identification, prevalence and rnymp polymorphism. Parasitology, New York, v. 93, p. 39-53, 1986.

ROLLINSON, D.; STOTHARD, J. R.; SOUTHGATE, V. R. Interactions between intermediate snail hosts of the genus *Bulinus* and schistosomes of the *Schistosoma haematobium* group. Parasitology, New York, v. 123, p. 245-260, 2001.

RODRIGUES, N. B.; et al. Microsatellite-enriched genomic libraries as a source of polymorphic loci for *Schistosoma mansoni*. Molecular Ecology, Oxford, v. 7, p. 263-265, 2007.

ROZAS, J.; LIBRADO, P. DnaSP v5: Software for comprehensive analysis of DNA polimorfismo data. Bioinformatics, Barcelona, v. 25, p. 1451-1452, 2009.

RUDGEA, J. W.; et al. Micro-epidemiology of urinary schistosomiasis in Zanzibar: Local risk factors associated with distribution of infections among schoolchildren and relevance for control. Acta Tropica, Amsterdam, v. 105, p. 45-54, 2008.

SAPP, K. K.; LOKER, E. S. A comparative study of mechanisms underlying digenean-snail specificity: in vitro interactions between hemocytes and digenean larvae. Journal Parasitology, Lawrence, v. 86, n. 5, p. 1020-1029, 2000.

SIMÕES, M. C. M. Detecção de polimorfismo de base única em etiquetas de seqüências expressas de *Schistosoma mansoni*. 2005. Dissertação (Mestrado)- Fundação Oswaldo Cruz, Minas Gerais, 2005.

SIMPSON, A. J. G.; et al. The arrangement of ribosomal RNA genes in *Schistosoma mansoni*. Identification of polymorphic structural variants. European Journal of Biochemical, Holanada, v. 139, p. 41-45, 1984.

SNYDER, S.D.; LOKER, E. S. Evolutionary relationships among the schistosomatidae (Platyhelminthes: Digenea) and an Asian origin for *Schistosoma*. Journal Parasitology, Lawrence, v. 86, p. 283-288, 2000.

SIRE, C.; et al. Genetic diversity and recruitment pattern of *Schistosoma mansoni* in a *Biomphalaria glabrata* snail population: A field study using random-amplified polymorphic DNA markers. Journal Parasitology, Lawrence, v. 85, n. 3, p. 436-441, 1999.

SIRE, C.; et al. Genetic diversity of *Schistosoma mansoni* within and among individual hosts (*Rattus rattus*): intrapopulation differentiation at microspatial scale. International Journal for Parasitology, Oxford, v. 31, p. 609-1616, 2001.

SHORT, R. B.; MENZEL, M. Y. Chromosomes of nine species of schistosomes. Journal Parasitology, Lawrence, v. 46, p. 273-287, 1960.

SHORT, R. B.; MENZEL, M. Y.; PATHAK, S. Somatic chromosomes of *Schistosoma mansoni*. Journal Parasitology, Lawrence, v. 65, n. 3, p. 471-473, 1979.

SHORT, R. B.; GROSSMAN, A. L. Conventional giemsa and C-banded karyotypes of *Schistosoma mansoni* and *S. rodhaini*. Journal Parasitology, Lawrence, v. 46, p. 273-287, 1981.

SHRIVASTAVA, J.; et al. Population genetics of multi-host parasites the case for molecular epidemiological studies of *Schistosoma japonicum* using larval stages from naturally infected hosts. Parasitology, New York, v. 131, n. 5, p. 617-26, 2005.

SOUZA, C. P.; LIMA, L. C. Moluscos de interesses parasitológico do Brasil. Belo Horizonte: Centro de pesquisa René Rachou, 1997.

SPSS IN. Computer program of statistic. Chicago, 2004.

STADEN, O. D. Experimental infection of *Australorbis glabratus* with *Schistosoma mansoni* I. Individual and mass infection of snail, and the relationship of infection to temperature and season. Annals Tropical and Medical Parasitology, Leeds, v. 46, p. 48-53, 1952

STEINMANN, T.; et al. Air-flow sensitive hairs: boundary layers in oscillatory flows around arthropod appendages. The Journal of Experimental Biology, San Diego, v. 209, p. 4398-4408, 2006.

STEINAUER, M. L.; et al. Genetic structure of *Schistosoma mansoni* in western Kenya: the effects of geography and host sharing. International Journal of Parasitology, Oxford, v. 39, p. 1353-1362, 2009.

STRICKLAND, T. G. Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases. 8. ed. Cidade: W.B. Saunders Company, , 2000.

SOUZA, C. P.; LIMA L. C. Moluscos de interesse parasitológico do Brasil. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 1997.

THÉRON, A. Dynamics of larval populations of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*. II-Chronobiology of the intramolluscal larval development during the shedding period. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, San Diego, v. 75, p. 547-554, 1981.

THÉRON, A.; POINTIER, J. P. Ecology, dynamics, genetics and divergence of trematode populations in heterogeneous environments: the model of *Schistosoma mansoni* in the insular focus of Guadeloupe. Research and Reviews in Parasitology, New York, v. 55. n. 1. P. 49-64. 1995

THÉRON, A.; PAGES, J. R.; ROGNON, A. *Schistosoma mansoni*: distribution patterns of miracidia among *Biomphalaria glabrata* snail hosts as related to host susceptibility and sporocyst regulation process. Experimental Parasitology, San Diego, v. 85, p. 1-9, 1997.

THIELE E. A.; et al. Genetic diversity and population structuring of *Schistosoma mansoni* in a Brazilian village. International Journal for Parasitology, Oxford, v 38, p. 389-399, 2008.

THIENGO, S. C.; et al. Freshwater snails and Schistosomiasis Mansonii in the State of Rio de Janeiro, Brazil: I – Metropolitan Mesoregion. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 96, supl. p. 177-184, 2001.

UETA, M. T. Alguns aspectos da biologia de *Lymnaea columella* Say, 1817 (Gastropoda, Pulmonata). Revista de Saúde Pública, São Paulo, v. 10, p. 355-366, 1976.

UTZINGER, J.; et al. Random spatial distribution of *Schistosoma mansoni* and hookworm infections among school children within a single village. Journal of Parasitology, Lawrence, v. 89, p. 686-692, 2003.

VALADARES, et al. *Schistosoma mansoni*: aspectos da ovoposição da cepa LE em camundongos infectados com um casal de vermes. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo, v. 23. p. 6-11. 1981.

WEBSTER, J. P.; DAVIES. Spatio-temporal genetic variability in the *Schistosoma intermediate* host *Biomphalaria pfeifferi*. Annals of Tropical Medicine & Parasitology, Leeds, v. 95, n. 5, p. 515-527, 2001.

WEBSTER, J. P.; GOWER, C. M.; BLAIR, L. Do Hosts and Parasites Coevolve? Empirical Support from the *Schistosoma* System. The American Naturalist, Chicago, v. 164, p. 33-51, 2004.

WEBSTER, B. L.; TCHUENTE, L. A. T.; SOUTHGATE, V. R. A single-strand conformation polymorphism (SSCP) approach for investigating genetic interactions of *Schistosoma haematobium* and *Schistosoma guineensis* in Loum, Cameroon. Parasitology Research, New York, v. 100, p. 739-745, 2007.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprints genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Research, Oxford, v. 18, p. 7213-7218, 1990.

WILLIAMS J.G.K.; et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers Nucleic Acids Research, Oxford, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

WELSH, J. C.; Mc-CLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Research, Oxford, v. 18, p. 7213-7218, 1990.

WRIGHT, S. Evolution in Mendelian populations. Genetics, New York, v.16, p. 97-159, 1931.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. Annal Eugenics, New York, v. 15, p. 323-354, 1951.

WRIGHT, S. Evolution and the Genetics of Populations. Variability Within and Among Natural Populations. University of Chicago Press, Chicago, IL. v. 4. p. 242-322. 1978.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Report of the WHO informal consultation on Schistosomiasis in low transmission areas: control strategies and criteria for elimination. London, 2001.

WOODRUFF, D. S.; MULVEY, M. Neotropical schistosomiasis: African affinities of the host snail *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda: Planorbidae). Biological Journal of the Linnean Society, London, v. 60, p. 505-516, 1997.

WOOLLEY, S. M.; POSADA, D.; CRANDALL, K. A. A comparison of phylogenetic network methods using computer simulation. Plos One, San Francisco, v. 3, n. 4, p. 1-12, 2007.

YOSHINO, T. P.; VASTA, G. R. Parasite-Invertebrate host immune interactions. Advances in comparative and environmental physiology, London, v. 24, p. 125-158, 1996.

ZHAO, Q. P.; et al. Distinct Genetic Diversity of *Oncomelania hupensis*, Intermediate Host of *Schistosoma japonicum* in Mainland China as Revealed by ITS Sequences. PloS Neglected Tropical Diseases, San Francisco, v. 4, n. 3, p. 1-9, 2010.

ZHOU, X. N.; et al. Spatial epidemiology in zoonotic parasitic diseases: insights gained at the 1st International Symposium on Geospatial Health in Lijiang, China, 2007. Parasite & Vector, Orlando, v. 2, n. 10, p. 1-16, 2009.

APÊNDICE

Genética de Schistosoma mansoni

Apêndice A. Saída das análises de correlação canônica sobre os fatores abióticos

Axes	1	2	3	4	Total Inertia
Eigenvalues:	0.415	0.065	0.016	0.892	2.917
Species-environment correlations:	0.684	0.317	0.245	0	
Cumulative percentage variance					
of species data:	14.2	16.5	17	47.6	
of species-environment relation:	83.8	96.9	100	0	
Sum of all eigenvalues					2.917
Sum of all canonical eigenvalues					0.496
*** Unrestricted permutation ***					
Seeds: 23239 945					
**** Summary of Monte Carlo test ****					
Test of significance of first canonical axis:					
eigenvalue =	0.415				
F-ratio =	16.443				
P-value =	0.002				

Apêndice B. Saída das análises de correlação canônica sobre os fatores bióticos

Axes	1	2	3	4	Total Inertia
Eigenvalues:	0.585	0.07	0.585	0.070 0.034	0.012 2.917
Species-environment correlations:	0.822	0.386	0.286		0.17
Cumulative percentage variance					
of species data:	20.1	22.5	23.6		24
of species-environment relation:	82.5	92.3	97.2		98.9
Sum of all eigenvalues					2.917
Sum of all canonical eigenvalues					0.709
*** Unrestricted permutation ***					
Seeds: 23239 945					
** Summary of Monte Carlo test **					
Test of significance of first canonical axis:					
eigenvalue =	0.585				
F-ratio =	23.58				
P-value =	0.004				

Genética de Schistosoma mansoni

Apêndice D. Distribuição da abundância relativa dos *Biomphalaria glabrata* e da positividade por *Schistosoma mansoni*, na localidade de Impôeira, municípios Goiana-PE, período 2008-2009.

Estações	jun/08		jul/08		ago/08		set/08		out/08		nov/08		dez/08		jan/09		fev/09		mar/09		abr/09		mai/09	
	Col	Pos																						
1	21	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	21	1	3	-
2	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	-	-	-
3	13	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	22	-	-	-	55	-	-	-
4	2	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13	-	13	-	8	1	-	-
5	30	1	-	-	-	-	9	-	-	-	-	-	7	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	23	-	37	-	32	-	69	2	14	-	5	-	5	-	1	1	-	-
7	73	1	-	-	-	-	-	-	-	-	8	-	-	-	-	-	-	-	1	-	0	-	4	-
8	-	-	18	2	39	-	17	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	8	-	2	-	
9	60	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-
10	-	-	96	-	27	15	15	1	20	1	-	-	-	-	49	3	32	2	98	-	98	-	57	2

Genética de Schistosoma mansoni

Apêndice E. Distribuição da abundância relativa dos *Biomphalaria straminea* e da positividade por *Schistosoma mansoni*, na localidade de Ponta de Pedra, municípios Goiana-PE, período 2008-2009.

Estações	Jun/08		Jul/08		Ago/08		Set/08		Out/08		Nov/08		Dez/08		Jan/09		Fev/09		Mar/09		Abr/09		Mai/09	
	Col	Pos																						
1	140	-	179	-	319	-	290	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
2	69	-	77	-	106	-	73	-	51	-	85	-	56	-	16	-	0	-	16	-	33	-	70	-
3	70	-	20	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
4	10	-	41	-	32	-	65	-	22	-	45	-	29	-	71	-	4	-	5	-	105	-	36	-
5	124	-	159	-	30	-	0	-	23	-	10	-	91	-	2	-	4	-	24	-	98	-	44	-
6	139	-	181	-	344	-	77	-	164	-	0	-	9	-	7	-	2	-	10	-	298	-	151	-
7	0	-	64	-	136	-	4	-	163	-	0	-	30	-	12	-	11	-	49	-	99	-	245	-
8	0	-	0	-	311	-	52	-	7	-	0	-	16	-	0	-	1	-	7	-	250	-	104	-

Ecologia de Biomphalaria e Genética de Schistosoma mansoni

Apêndice F. Número de vermes adultos de *Schistosoma mansoni* analisados e a localização geográfica dos 9 municípios do Estado de Pernambuco selecionados para os estudo de genética de populações na escala regional.

Municípios	Nº Parasitos Adultos	Latitude	Longitude
Goiana	45	07° 35' 44,2"S	34° 53' 30"W
Timbaúba	2	07° 30' 18"S	35° 19' 04"O
São Lourenço da Mata	7	08° 00' 07"S	35° 01' 04"O
Paulista	6	07° 56' 27"S	34° 52' 22"O
Jaboatão dos Guararapes	22	08° 06' 46"S	35° 00' 54"O
Ipojuca	8	08° 24' 00"S	35° 03' 45"O
Cortês	12	08° 28' 12"S	35° 32' 27"O
Gameleira	17	08° 35' 02"S	35° 23' 13"O
Garanhuns	11	08° 44' 31"S	36° 20' 02"O

Apêndice G. Número de vermes adultos de *Schistosoma mansoni* analisados e a localização geográfica das 4 localidades do municípios de Goiana-PE selecionados para os estudo de genética de populações na escala local.

Localidades	Nº Parasitos Adultos	Latitude	Longitude
Ponta de Pedra	6	-07 37' 50.64279"	-34 48' 43.31270"
Carne de Vaca	9	-07 34' 37.36530"	-34 50' 01.62964"
São Lourenço	9	-07 35' 15.70759"	-34 50' 59.66492"
Impôeira	30	-07 33' 19.69540"	-34 59' 49.28833"

Apêndice H. Identificação da variabilidade genética das 9 populações de *Schistosoma mansoni* selecionada dos municípios do Estado de Pernambuco com ajuda dos *primers* OP-A9, OP-B6 e OP-G13.

<i>Primers</i>	Locos	Size	Ht	Hs	Gst	Nm*
OP-A9	2180	130	0,1041	0,0937	0,0999	45,033
	2150	130	0,1678	0,1532	0,0868	52,577
	2100	130	0,2345	0,0392	0,8326	0,1005
	2050	130	0,1312	0,1154	0,1198	36,728
	2036	130	0,211	0,1919	0,0906	50,214
	1950	130	0,3334	0,2802	0,1596	26,338
	1730	130	0,183	0,1723	0,0585	80,512
	1636	130	0,4237	0,2979	0,2969	11,842
	1480	130	0,154	0,1413	0,0826	55,505
	1380	130	0,3959	0,3328	0,1595	26,346
	1350	130	0,0282	0,026	0,0776	59,409
	1280	130	0,2622	0,252	0,0388	123,929
	1180	130	0,1815	0,1383	0,2381	15,996
	1080	130	0,1523	0,1395	0,0841	54,435
	1018	130	0,0538	0,0517	0,0388	123,804
	850	130	0,4336	0,3578	0,1749	23,596
	750	130	0,3553	0,3114	0,1237	35,432
	650	130	0,2355	0,1751	0,2564	14,501
	506	130	0,4235	0,3459	0,1834	22,268
396	130	0,0643	0,0568	0,1166	37,882	
OP-B6	6108	130	0,0177	0,0171	0,0326	14,853
	5090	130	0,0177	0,0171	0,0326	14,853
	3900	130	0,0177	0,0171	0,0326	14,853
	3800	130	0,0177	0,0171	0,0326	14,853
	3500	130	0,2794	0,2454	0,1217	36,068
	3200	130	0,2917	0,2568	0,1196	36,814
	3054	130	0,4951	0,3655	0,2617	14,103
	2036	130	0,497	0,3418	0,3122	11,015
	1880	130	0,3348	0,2884	0,1384	31,119
	1750	130	0,31	0,277	0,1063	42,016
	1636	130	0,4701	0,3742	0,2041	19,503
	1018	130	0,4871	0,3825	0,2148	18,279
	980	130	0,4697	0,3225	0,3132	10,962
	850	130	0,2545	0,2308	0,0934	48,541
	700	130	0,1636	0,1383	0,1547	27,331

Apêndice H. Continuação

<i>Primers</i>	Locos	Size	Ht	Hs	Gst	Nm*
	4072	130	0,4807	0,2901	0,3966	0,7608
	4020	130	0,0255	0,0238	0,0673	6,93
	3900	130	0,018	0,0171	0,054	87,674
	3800	130	0,1159	0,1	0,1376	3,134
	3750	130	0,4955	0,3306	0,3328	10,025
	3054	130	0,0051	0,005	0,0205	23,903
	2850	130	0,3786	0,2585	0,3172	10,761
	2180	130	0,4893	0,3066	0,3734	0,8391
OP-G13	2050	130	0,4996	0,2668	0,4659	0,5732
	1980	130	0,4999	0,1535	0,693	0,2215
	1636	130	0,3391	0,1492	0,5599	0,3929
	1480	130	0,3503	0,2113	0,3968	0,7601
	1120	130	0,4901	0,1854	0,6217	0,3042
	980	130	0,4947	0,1979	0,6	0,3333
	690	130	0,4575	0,2616	0,4282	0,6676
	580	130	0,4999	0,259	0,4819	0,5375
	506	130	0,2275	0,1904	0,163	25,671
Média			0,274	0,1919	0,2995	11,694
St. Dev			0,0309	0,0138		

Nota: St. Dev= Desvio Padrão

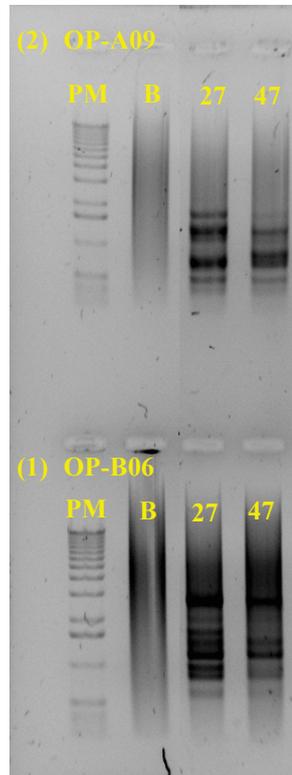
Genética de *Schistosoma mansoni*

Apêndice I. Identificação da variabilidade genética das 4 populações de *Schistosoma mansoni* selecionada no município de Goiana-PE com ajuda dos *primers* OP-A9, OP-B6 e OP-G13.

<i>Primers</i>	Locos	Nº Indivíduos	Ht	Hs	Gst	Nm*
OP-B6	6108	54	0,0253	0,0243	0,0390	123,246
	5090	54	0,0253	0,0243	0,0390	123,246
	3900	54	0,0253	0,0243	0,0390	123,246
	3800	54	0,0253	0,0243	0,0390	123,246
	3500	54	0,1751	0,1562	0,1079	41,325
	3200	54	0,3967	0,2656	0,3306	10,122
	3054	54	0,4703	0,1715	0,6353	0,2870
	2036	54	0,4657	0,1785	0,6168	0,3106
	1880	54	0,2344	0,2289	0,0236	20,722
	1750	54	0,2648	0,258	0,0257	189,837
	1636	54	0,4739	0,3493	0,2628	14,023
	1018	54	0,4768	0,3456	0,2751	13,172
	980	54	0,3577	0,3224	0,0988	45,614
	850	54	0,1667	0,1498	0,1010	44,495
700	54	0,1394	0,127	0,0892	51,042	
OP-G13	4072	54	0,4167	0,0749	0,8202	0,1096
	4020	54	0,0692	0,0615	0,1118	39,742
	3900	54	0,0426	0,0398	0,0668	69,848
	3800	54	0,1914	0,1522	0,2047	19,422
	3750	54	0,4974	0,261	0,4752	0,5521
	2850	54	0,1584	0,1432	0,0956	47,309
	2180	54	0,4932	0,2499	0,4933	0,5136
	2050	54	0,4192	0,3535	0,1567	26,911
	1980	54	0,3554	0,21	0,4092	0,722
	1636	54	0,4899	0,3137	0,3597	0,8901
	1480	54	0,0426	0,0398	0,0668	69,848
	1120	54	0,1528	0,1111	0,2727	13,333
	980	54	0,302	0,2319	0,2322	1,653
	690	54	0,2757	0,2198	0,2028	19,653
580	54	0,3517	0,2331	0,3371	0,9832	
506	54	0,3155	0,2519	0,2018	19,775	
Média			0,2514	0,1696	0,3253	10,368
St. Dev.			0,0308	0,0125		

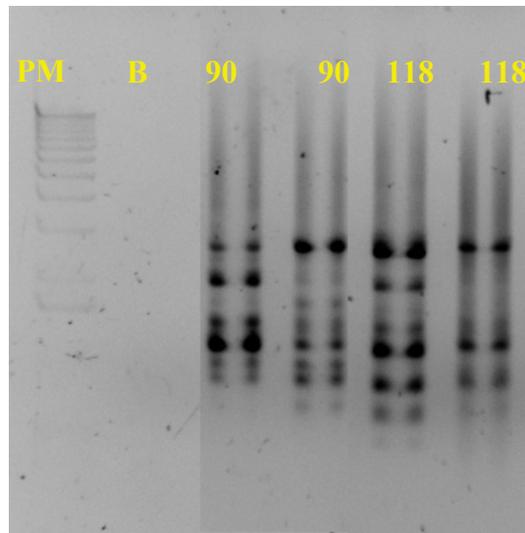
Nota: St. Dev= Desvio Padrão

Apêndice Ja. Padronização RAPD-PCR através do uso de diferentes termocicladores.



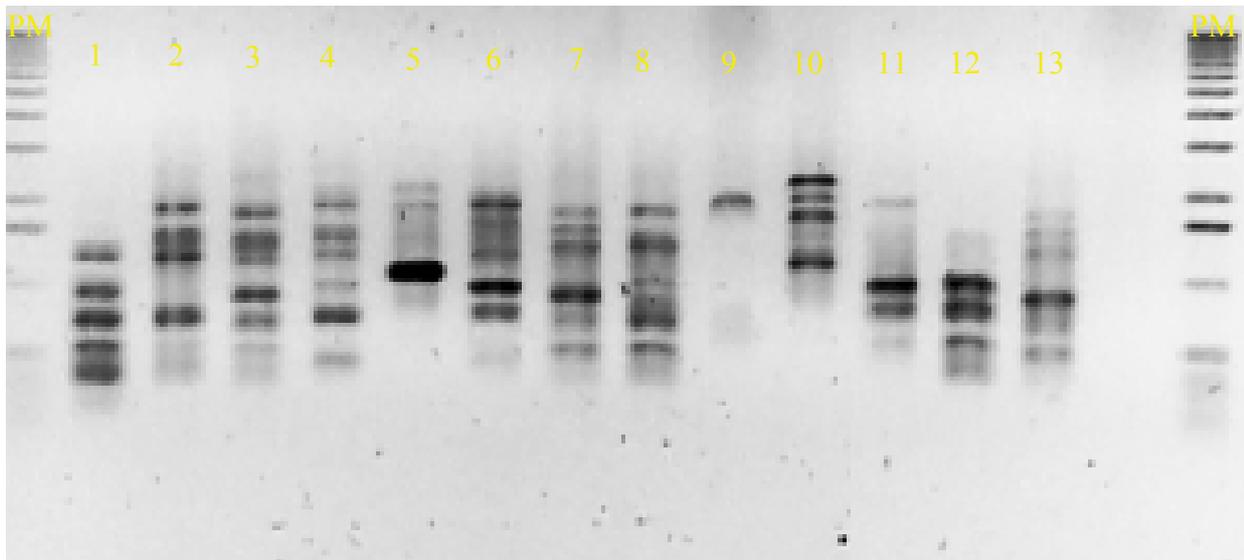
Ordem das Amostras: (1) *Primer* OP-A09; PM=Peso Molecular; B= Controle Negativo; N° 27; N° 47; e (2) *Primer* OP-B06; PM=Peso Molecular; B= Controle Negativo; N° 27; N° 47.

Apêndice Jb. Reprodutividade dos Perfis genéticos identificados com ajuda do *primers* selecionados OP-B06 nas populações de *Schistosoma mansoni* analisadas do Estado de Pernambuco.

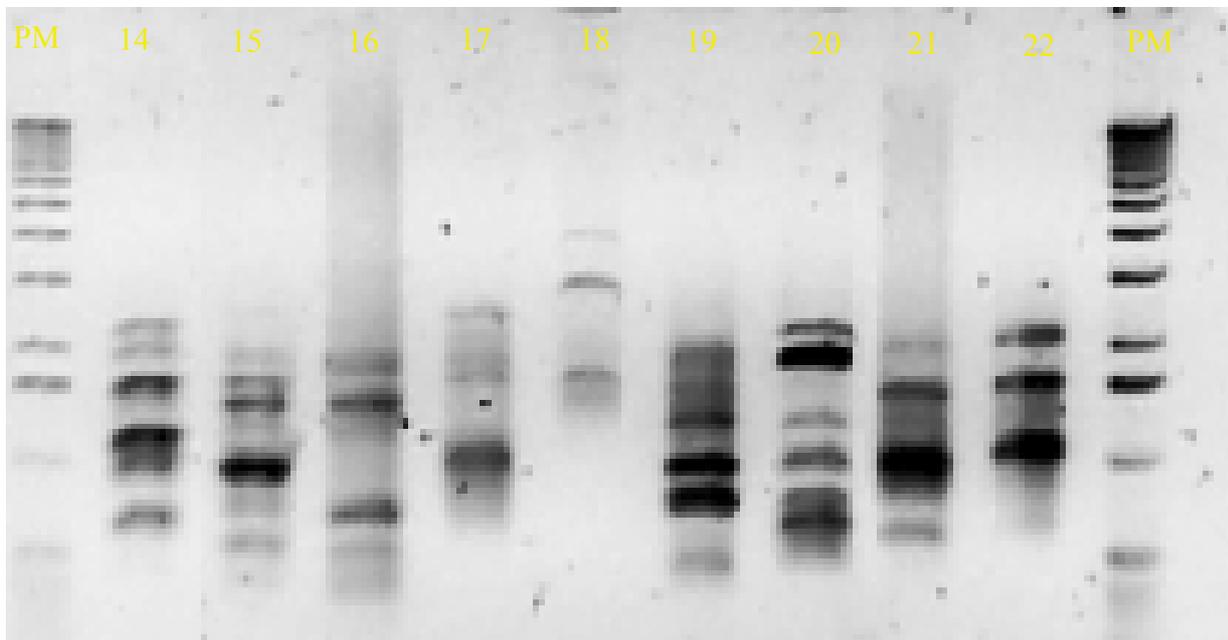


Ordem das Amostras: PM=Peso Molecular; B= Controle Negativo; N° 90; N° 90; N° 118; N° 118.

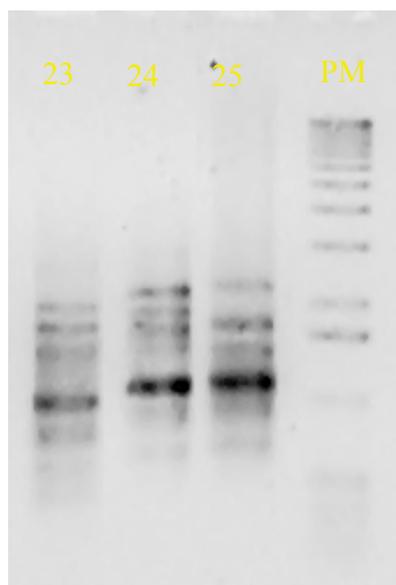
Apêndice K. Perfis genéticos identificados com ajuda do *primer* A09 nas 9 populações de *Schistosoma mansoni* analisadas do Estado de Pernambuco.



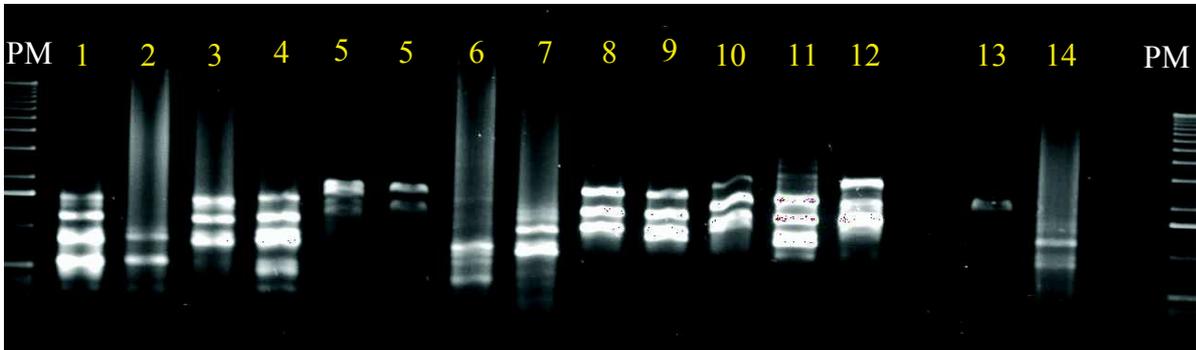
Apêndice K. Continuação.



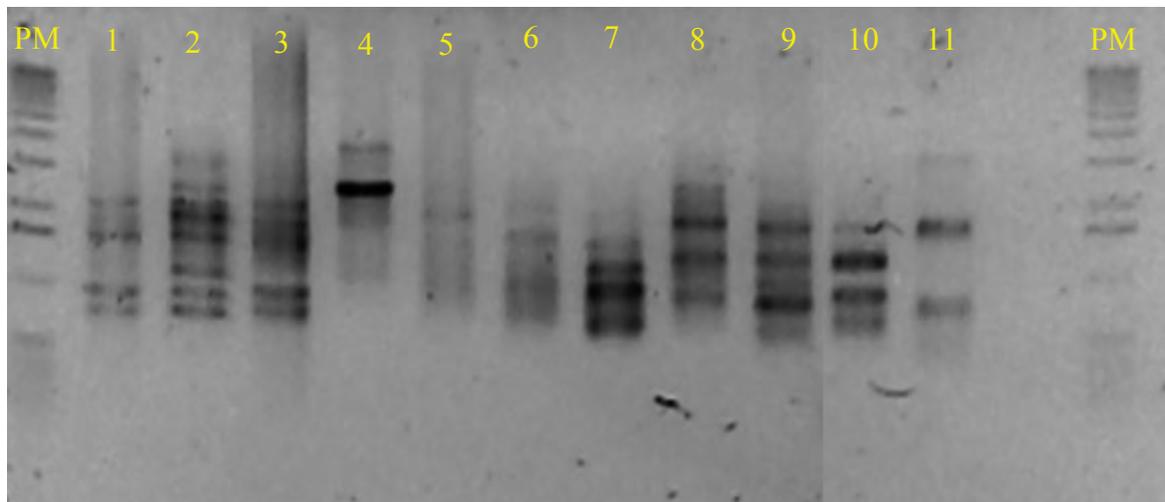
Apêndice K. Continuação.



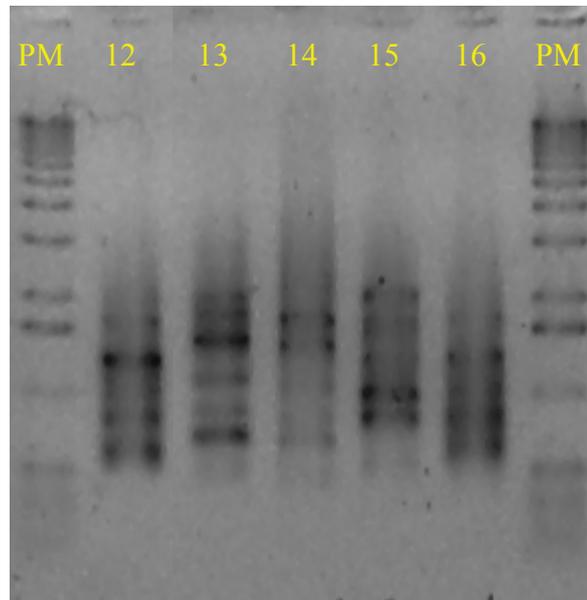
Apêndice L. Perfis genéticos identificados com ajuda do *primer* A10 nas 9 populações de *Schistosoma mansoni* analisadas do Estado de Pernambuco.



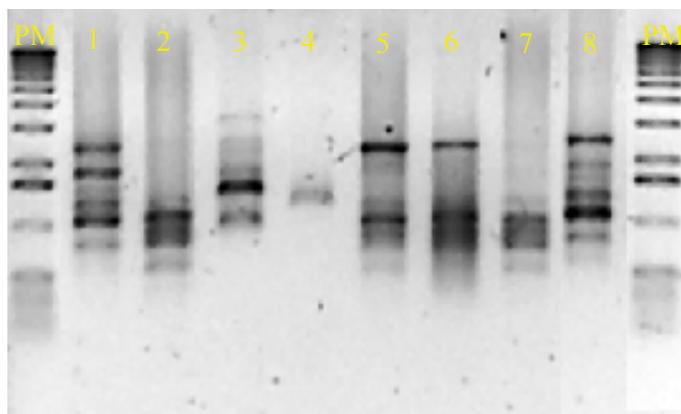
Apêndice M. Perfis genéticos identificados com ajuda do *primer* A13 nas 9 populações de *Schistosoma mansoni* analisadas do Estado de Pernambuco.



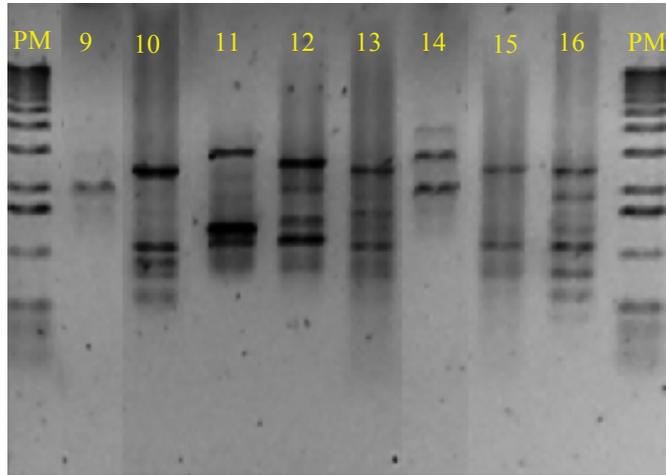
Apêndice M. Continuação



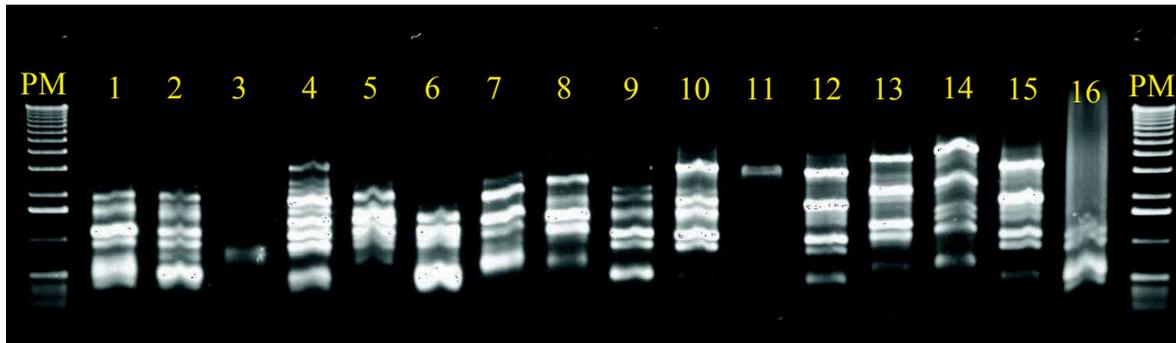
Apêndice N. Perfis genéticos identificados com ajuda do *primer* B06 nas 9 populações de *Schistosoma mansoni* analisadas do Estado de Pernambuco.



Apêndice N. Continuação



Apêndice O. Perfis genéticos identificados com ajuda do *primer* G13 nas 9 populações de *Schistosoma mansoni* analisadas do Estado de Pernambuco.



ANEXO A

Current epidemiological status of schistosomiasis in the state of Pernambuco, Brazil

Constança Simões Barbosa^{1/+}, Karina Conceição Araújo², Manuel Alexander Amarista Sevilha¹, Fabio Melo¹, Elaine Christine de Souza Gomes^{1,3}, Reinaldo Souza-Santos⁴

¹Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães-Fiocruz, Av. Moraes Rego s/nº, 50670-420 Recife, PE, Brasil ²**POR FAVOR, COMPLETE OS DADOS INSTITUCIONAIS** Universidade Federal de Sergipe ³**POR FAVOR, COMPLETE OS DADOS INSTITUCIONAIS** Universidade Federal de Pernambuco ⁴Departamento de Endemias Samuel Pessoa, Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca-Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Uncontrolled peripheral urbanisation coupled with environmental degradation has affected the status of schistosomiasis in Pernambuco (PE), Brazil. This endemic disease continues to perpetuate its transmission in rural areas and has also become a cause for concern in coastal towns of the state. The lack of basic infrastructure (sanitation and health programmes) to support the new urban areas leads to faecal contamination of natural aquatic environments, resulting in consequent infection of vector snails and the emergence of new sources of schistosomiasis transmission. In the present paper, we discuss the current epidemiological status of schistosomiasis in PE. We have consolidated and analysed information from parasitological, malacological and morbidity surveys undertaken by the group of researchers at the Laboratory of Schistosomiasis, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-Fiocruz. The results of our analysis show: (i) the maintenance of the levels of schistosomiasis in the rural Zona da Mata, PE, (ii) the record of the human cases of schistosomiasis and the foci of infected snails detected along the coast of PE through 2007, (iii) the high record of the severe clinical form of schistosomiasis in the metropolitan region of Recife (RMR) and (iv) new breeding sites of schistosomiasis vector snails that were identified in a 2008 survey covering the RMR and the coastal localities of PE.

Key words: schistosomiasis - epidemiological monitoring - endemic diseases

In the state of Pernambuco (PE), uncontrolled development of peripheral urban areas together with environmental degradation has led to new health hazards for the human population. Among these is schistosomiasis, which was previously considered to be a rural endemic disease. The agricultural industry, comprised of large landholdings of sugarcane monoculture, which is socially and economically excluding by nature, has invested little in healthcare for rural workers. Opportunities for employment on the land have been decreasing and this has led to the migration of large proportions of the rural populations to urban centres. This has resulted in the appearance of schistosomiasis in the coastal regions where it has reproduced the transmission model found in rural areas and has demonstrated a concerning tendency towards endemisation.

On the periphery of coastal urban areas, the lack of basic infrastructure (sanitation and health services) to support new urban development has resulted in faecal contamination of natural aquatic environments. Consequently, vector molluscs have become infected and new foci of schistosomiasis transmission have arisen. Environmental, climatic and human-engendered disturbances

have put populations at risk that have never been previously exposed to this disease. The heavy rains that occur on the coast of PE between the months of May and August cause breeding sites to overflow, thereby carrying infected molluscs into streets and backyards. Healthy individuals become exposed through this route and outbreaks of acute cases of schistosomiasis now occur even among middle and upper-class individuals (Barbosa et al. 1998, 2000, 2001a, b, 2004, Silva et al. 2006, Araújo et al. 2007, Souza 2008, Souza et al. 2008).

The Schistosomiasis Laboratory of the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-Fiocruz (CpqAM-Fiocruz) has 20 years of experience researching schistosomiasis epidemiology and control and, in partnership with researchers from other institutions, has accumulated an important collection of published papers on the occurrence of this endemic disease in PE. Recently, the researchers and collaborators at this laboratory created a research group that has been registered as the XisCanoe Program at the website <http://200.17.137.109:8081/xiscanoe>. The purpose of this program is to assemble knowledge in order to understand and analyse structures and processes related to schistosomiasis transmission on the coast of PE. The program brings together postgraduate students from different fields and provides training to enable a holistic view of the biological, socioeconomic and cultural determinants of Manson's schistosomiasis.

The aim of this paper was to compile the information resulting from various epidemiological surveys and a recent scientific expedition conducted by the researchers of the Schistosomiasis Laboratory of CpqAM-Fiocruz

Financial support: SVS/MS

+ Corresponding author: cbarbosa@cpqam.fiocruz.br

Received 22 January 2009

Accepted 4 September 2009

in order to assess the current epidemiological status of schistosomiasis in PE. The results of those investigations have allowed us to (i) determine the prevalence among humans in the endemic area (Zona da Mata), (ii) record the human cases and the foci of infected molluscs occurring in coastal areas from 1998-2007, (iii) survey the occurrence of severe clinical forms of the disease and (iv) identify new breeding sites and foci of vector snails in the metropolitan region of Recife (RMR) and coastal area through a recent malacological survey.

MATERIALS AND METHODS

The epidemiological surveys analysed in the present study were coordinated by researchers who form part of the Schistosomiasis Laboratory of CpqAM-Fiocruz and resulted from several research projects that were implemented between 1998-2008. In addition, a scientific expedition was undertaken in 2008 to update the records regarding foci of vector molluscs for schistosomiasis along the entire coastline of PE. The methodological procedures are described as follows:

The prevalence of schistosomiasis in the endemic area of PE was updated by means of a coproscopic survey carried out in 2005 on representative samples from schoolchildren aged 9-12 years. The 46 municipalities that make up the Zona da Mata of PE [(ZMP); “forest zone”], the endemic area for schistosomiasis in PE, were included in this survey (Barbosa et al. 2006) (Fig. 1). The tests were performed using the Kato-Katz method (Katz et al. 1972) with one sample from each individual.

Epidemiological studies that have been conducted since 1998 were used to investigate human cases of the acute and/or chronic clinical forms of schistosomiasis in beach localities where tourism and leisure activities are prevalent. Human cases and foci of vector molluscs were identified through active searches of sampled or census-based coproscopic or malacological surveys of coastal localities. The choices of areas to be investigated were made based on the index of human cases referred to CpqAM-Fiocruz by local health services and on active random searches for snails that were positive for *Schistosoma mansoni* in litoral areas (Barbosa et al. 1998, 2000, 2001a, b, Araújo et al. 2007, Souza et al. 2008).

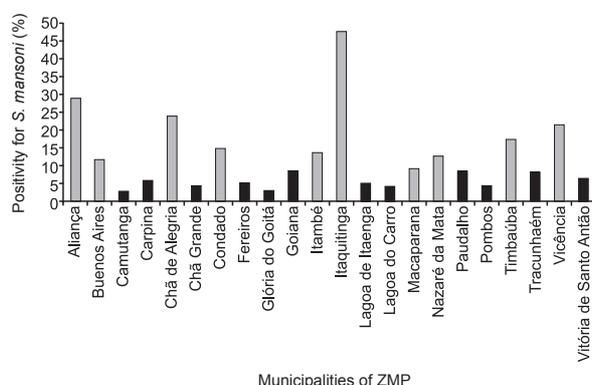


Fig. 1: positivity for *Schistosoma mansoni* among schoolchildren in the municipalities of the Zona da Mata of Pernambuco (ZMP), September 2005.

The severe clinical forms of schistosomiasis were surveyed by means of a case series study on schistosomotic myeloradiculopathy cases that were found by searching and reviewing the medical records of Hospital das Clínicas, Hospital da Restauração and Instituto Materno Infantil de Pernambuco, between 1994-2006 (Araújo et al. 2006, Cunha et al. 2007, Lobo et al. 2007).

Updated observations of the schistosomiasis breeding sites and foci on the coastline of PE were made between September 15-20th 2008 through a scientific expedition formed by 11 researchers from CpqAM-Fiocruz who are specialists in malacology and epidemiology (Barbosa et al. 2008). They carried out a malacological survey covering the RMR and coastal localities of the state with the objective of updating and mapping the presence of new foci of the schistosomiasis vector snails. This scientific expedition covered a distance of 780 km along the northern and southern coastlines of PE in a zone parallel to the coast and at a distance of 2 km from the sea. The expedition investigated all water bodies in urbanised areas and other areas of epidemiological importance (i.e., areas with easy access and human contact). Snails were collected systematically by sweeping these areas for 30 min-2 h, depending on the extent and accessibility of the breeding site. Subsequent examination using the light exposure test in the laboratory determined whether the specimens were positive for *S. mansoni* (Standen 1952). The batches of molluscs that remained negative were subjected to a molecular diagnostic test (PCR-single tube) to identify the DNA of the parasite (Abath et al. 2002). The breeding sites were georeferenced and the index of relative abundance was estimated as the number of molluscs collected per unit of time and effort. This analysis, together with mollusc infection rates, was used to generate a map of the disease in PE coast areas.

RESULTS

The survey carried out in 2005 to update the prevalence data in rural zones of PE covered 271 schools that had been randomly selected in 179 localities in the 43 municipalities that make up the rural region of the ZMP (Fig. 2). In this survey, 11,234 schoolchildren ranging in age from 9-12 years were examined and 1,625 individuals presented parasitism with *S. mansoni*. The mean rate of positive findings was 14.4%. The geometric mean parasite burden among the population sampled was 67.9 eggs per gram of faeces. These indicators attest to the significant morbidity caused by schistosomiasis, especially considering the severity of the infection that had already become established in this young population.

Human cases of the acute and/or chronic clinical forms of schistosomiasis and foci of vector molluscs have been recorded through epidemiological studies conducted at beach locations where tourism and leisure activities are prevalent. Thirty-three acute cases were identified at Praia do Forte on Itamaracá Island (1998) and 442 acute cases were identified at Praia Porto de Galinhas in Ipojuca (2000). The clinical form of the disease could not be differentiated at the other coastal localities investigated because there has not been any clinical

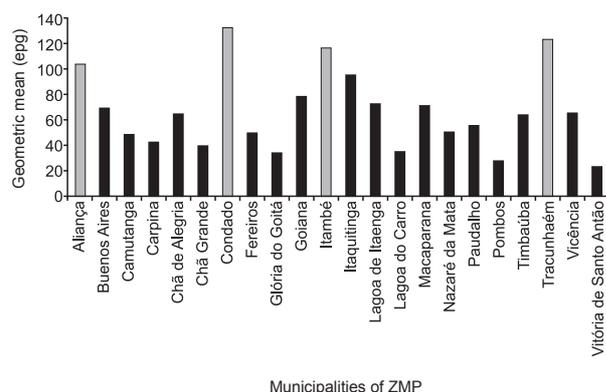


Fig. 2: intensity of infection by *Schistosoma mansoni* among school-children in the municipalities of the Zona da Mata of Pernambuco (ZMP), September 2005. epg: eggs per gram.



Fig. 3: foci of schistosomiasis and vector molluscs identified on the coast of Pernambuco, Brazil, between 2000-2007.

investigation of the 539 positive human cases detected in Lagoa das Garças (RMR) in 2003, the 231 cases detected in Praia Carne de Vaca (Goiana) in 2006 and the 12 cases detected in Praia Ponta de Pedras (Goiana) in 2007. In the latter two localities, no previous record of the disease was found.

At coastal localities where no parasitological surveys were performed, such as Enseada dos Golfinhos (Itamaracá), Janga and Pau Amarelo (Paulista), non-systematic malacological investigations were conducted during the rainy season and immediately afterwards (March-September) to collect, identify and investigate the infectiveness of the snails that are the intermediate hosts for *S. mansoni*. All of the snails collected between 2000-2007 were of the species *Biomphalaria glabrata*. Between 2000-2002 in Porto de Galinhas, 2,214 snails were collected. Of these, 16.1% eliminated cercariae of *S. mansoni*. In the Sotave settlement (RMR), 1,212 *B. glabrata* snails were collected in 2003 and the infection rate was 12.9%. The specimens of *B. glabrata* from Porto de Galinhas and Sotave were exposed individually to light in laboratory tests. A mean of 750 cercariae were eliminated after 20 min of exposure, with 1 mL pipetted from the 50 mL that was homogenised in each vessel. The results demonstrate the infective power of *B. glabrata* collected at the two localities. Between 2003-2005 in Janga and Pau Amarelo (Paulista), 445 molluscs were caught. Of these, 3.4% and 20%, respectively, were found to be infected. The localities that were determined to be transmission sites of schistosomiasis between 2000-2007 are detailed in Fig. 3.

The occurrence and persistence of severe clinical forms of schistosomiasis in PE are evident in the survey of cases of schistosomotic myeloradiculopathy that was carried out by investigating 11,145 medical files referred by PE hospitals over the last 13 years (Araújo et al. 2006, Cunha et al. 2007, Lobo et al. 2007). It was found that 529 medical files involved cases of myelopathy. Of these, 139 were cases of schistosomotic myeloradiculopathy (26.3%). There were greater percentages of cases among

TABLE I

Distribution of cases of schistosomotic myeloradiculopathy at three hospitals in Recife, Pernambuco (1994-2006), according to age group and sex

Age group (years)	Men		Women		Total	
	n	%	n	%	n	%
< 20	30	32.6	22	46.8	52	37.4
20-40	39	42.4	16	34	55	39.6
40-60	20	21.7	7	15	27	19.4
≥ 60	3	3.3	2	4.2	5	3.6
Total	92	100	47	100	139	100

young individuals, those with the hepatointestinal clinical form and those from the RMR (Tables I, II)

The scientific expedition, which provided a systematic and detailed investigation of the entire coastline of PE and the RMR, served to update previous records of the occurrences of breeding sites and foci of *Biomphalaria*. The expedition also recorded the introduction of new breeding sites and foci in these two regions, both in beach localities and in peripheral districts of the RMR (Fig. 4). Investigations were conducted in 11 municipalities and the 97 points investigated were georeferenced. In localities where *B. glabrata* that have been collected for several years, including Praia do Forte (Itamaracá), Janga, Pau Amarelo (Paulista), the presence of *Biomphalaria straminea* was detected for the first time. The *B. straminea* breeding site at Praia do Forte is situated 20 m from the sea. In Praia Mangue Seco (Igarassú) several specimens of *B. straminea* were collected 30 m from the sea. In Apipucos lake (RMR), specimens infected with *B. straminea* were diagnosed using the nested PCR technique to detect the DNA of *S. mansoni*.

TABLE II

Distribution of cases of schistosomal myeloradiculopathy at three hospitals in Recife, Pernambuco (1994-2006), according to the systemic clinical forms of schistosomiasis (Araújo 2008)

Clinical forms	HR	HC	IMIP	Total	%
Acute	-	3	-	3	2.2
Intestinal	-	5	-	5	3.6
Hepatosplenic	-	2	-	2	1.4
Hepatointestinal	-	6	-	6	4.3
Not available	100	13	10	123	88.5
Total	100	29	10	139	100

HC: Hospital das Clínicas; HR: Hospital da Restauração; IMIP: Instituto Materno Infantil de Pernambuco.

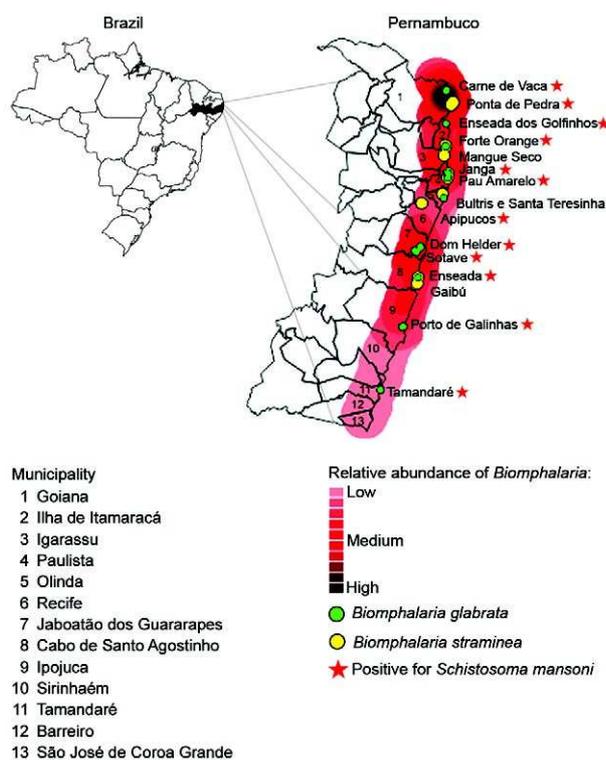


Fig. 4: updated map of breeding sites and foci of schistosomiasis on the coast of Pernambuco and the metropolitan region of Recife resulting from the scientific expedition of September 2008 (Barbosa et al. 2008).

DISCUSSION

Due to the tradition of research on schistosomiasis in PE, there is an important and up-to-date body of knowledge relating to the epidemiology, control, malacology, clinical characteristics, therapy, sociocultural relationships and behavioural traits of Manson's schistosomiasis. Previous and current studies provide insight regarding the current epidemiological status of this endemic

disease in this state. The investigations that have been conducted in various areas of the state have made it possible to identify and record sites that present a potential biological and environmental risk of schistosomiasis transmission and to identify concentrated areas of epidemiological vulnerability.

Along the coastal strip of the state and in the peripheral areas of the RMR, the environment is clearly being altered by the spatial occupation patterns and the destruction of natural resources. In particular, landfill in mangrove swamps and the use of sandbank areas for construction, small hotels and residential complexes of vacation homes for the middle and upper classes are affecting the environment. These patterns of land use and occupation are creating conditions that may be favourable for the establishment and proliferation of colonies of the vector snails that transmit schistosomiasis (Barbosa et al. 2000, 2001b, 2004).

The coast of PE, with its beautiful beaches and natural resources, stimulates internal and external tourism. At the same time, it is the target of unrestrained real estate speculation. The demand for unskilled labour (in civil construction, domestic services, craftwork sales and bars and restaurants) is attracting enormous numbers of individuals from unemployed rural populations. These people migrate to invaded areas on the urban periphery of the seashore in the RMR. Since not even minimal levels of sanitation infrastructure or access to healthcare and information are available to these populations, they end up contaminating the environment with faecal material that often contains eggs of *S. mansoni*.

A recent study of the Praia Porto de Galinhas carried out by environmental analysts revealed that "[...] uncontrolled urban development has caused Porto de Galinhas to lose its characteristics. Severe environmental impacts can be seen in the form of devastation and indiscriminate landfill in mangrove swamp areas [...] and in the form of sewage discharge into the rivers that cross the municipality; construction on the scrub vegetation along the shoreline; destruction of the coconut groves to keep up with the frenetic pace of the real estate sector and, finally, in the form of the increasing density of development in the central areas of Porto de Galinhas, which lack potable water and a basic sanitation network" (Barros 2004).

The recent map of the distribution of schistosomiasis foci in the RMR and along the coastline of PE shows the geographical expansion and spatial distribution of the mollusc's breeding sites and schistosomiasis foci in these areas. This gives rise to specific situations of risk for the resident population or for individuals who frequent these localities and it requires new forms of prevention and provision of care from the health services. Furthermore, the snails collected in these coastal localities were highly infected. This not only attests to the biological quality of the principal vector on the coast (*B. glabrata*), but also proves that active disease transmission is occurring in these places.

With regard to control measures for this endemic disease, the municipal healthcare services have had difficulty in meeting the standards for decentralised control defined by the Unified National Health System. This is

perhaps because of the occurrence of many other health problems, but it is also due to lack of defined priorities and lack of planning. Evaluation of the information system used by the schistosomiasis control programme, the Sistema de Informação do Programa de Controle da Esquistossomose (SISPCE), has revealed problems such as poor reliability of the prevalence estimates for *S. mansoni* (Pieri & Favre 2007). The percentage of the population studied was very low, which prevented determination of the prevalence and severity of schistosomiasis infection for the whole municipality. Recent studies have shown the inadequacy of the programme's actions with respect to schistosomiasis control in the RMR. It has been determined that 80% of the municipalities do not meet the standards recommended by the Ministry of Health for controlling the disease. There is no symmetry between the actions of different municipalities, suggesting that each municipality in the RMR has a different understanding regarding the SISPCE. The lack of connectivity and continuity among the control actions may contribute heavily to maintenance of transmission, since one activity depends on another for the control to be effective (Quinino et al. 2009).

In some municipalities of PE, the municipal teams responsible for controlling endemic diseases demonstrate a lack of readiness regarding their knowledge of the epidemiological situation, their skills for parasitological and malacological diagnosis and their planning for control actions. Special attention has been given to the coastal municipalities with localities in which schistosomiasis is still not perceived as a serious health hazard for the population. In this respect, the Schistosomiasis Reference Service of CpqAM-Fiocruz has been providing training for the municipal and state health services regarding techniques for parasitological and malacological diagnosis and has been holding workshops to develop projects aimed at controlling the disease. So far, 37 courses and training sessions have been held with the objectives of capacitating healthcare professionals, strengthening the experience of the municipal administration with the use of modern parasitological techniques and epidemiological tools that enable precise diagnosis and in planning actions to minimise situations of risk. For the municipalities of Itamaracá and Goiana, applications were constructed (Supplementary data) using the Geographical Information System. This is a valuable instrument for locating and characterising foci of schistosomiasis vectors and it allows managers to plan interventions according to whether the risk of schistosomiasis transmission is moderate or severe. However, much of the knowledge passed on through these training sessions has been ineffective because of rotation within the municipal teams and the particular criteria established by each municipality according to the availability of resources and equipment.

The studies outlined here illustrate the epidemiological complexity of schistosomiasis in PE and indicate the need for new studies to develop low-cost products with negligible environmental impact to facilitate control over vector molluscs (Favre et al. 2006). In addition, there is need to be new intervention strategies that allow greater diagnostic and treatment coverage for the communities

affected, which could be used as alternative tools for integrated control over schistosomiasis. Such control cannot be viewed outside of the social and economic context of the communities affected and it will only be achieved through social changes that involve improvements in the living conditions of the least favoured populations.

REFERENCES

- Abath FG, Melo FL, Werkhauser RP, Montenegro L, Montenegro R, Schindler HC 2002. Single-tube nested PCR using immobilized internal primers. *Biotechniques* 33: 1210-1214.
- Araújo KC 2008. *Perfil clínico e epidemiológico da mielorradiculopatia esquistossomótica em Pernambuco*, PhD Thesis, Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães-Fiocruz, Recife, 120 pp.
- Araújo KCGM, Resendes APC, Souza-Santos R, Silveira Júnior JC, Barbosa CS 2007. Análise espacial dos focos de *Biomphalaria glabrata* e de casos humanos de esquistossomose mansônica em Porto de Galinhas, Pernambuco, Brasil, no ano 2000. *Cad Saude Publica* 23: 409-417.
- Araújo KCGM, Rosa e Silva C, Barbosa CS, Ferrari TCA 2006. Clinical-epidemiological profile of children with schistosomal myeloradiculopathy attended at the Instituto Materno-Infantil de Pernambuco. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101 (Suppl. I): 149-156.
- Barbosa CS, Albuquerque J, Gomes ECS, Sevilha MAA, Melo F, Souza-Santos R 2008. Expedição científica para investigação malacológica no litoral de Pernambuco. Available from: <http://200.17.137.109:8081/xiscanoe/>.
- Barbosa CS, Araújo KC, Antunes L, Favre T, Pieri OS 2004. Spatial distribution of schistosomiasis foci in Itamaracá Island, Pernambuco, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99 (Suppl. I): 79-83.
- Barbosa CS, Domingues AL, Abath F, Montenegro SM, Guida U, Carneiro J, Tabosa B, Moraes CN, Spinelli V 2001a. Epidemia de esquistossomose aguda na praia de Porto de Galinhas, Pernambuco, Brasil. *Cad Saude Publica* 17: 725-728.
- Barbosa CS, Favre TC, Wanderley TN, Callou AC, Pieri OS 2006. Assessment of schistosomiasis, through school surveys, in the forest zone of Pernambuco, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101 (Suppl. I): 55-62.
- Barbosa CS, Gonçalves JF, Barbosa FS, Albuquerque Y 1998. Urban schistosomiasis in Itamaracá Island, Pernambuco, Brazil: epidemiological factors involved in the recent endemic process. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93 (Suppl. I): 265-266.
- Barbosa CS, Montenegro SML, Abath FGC, Domingues ALC 2001b. Specific situations related to acute schistosomiasis in Pernambuco, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96 (Suppl.): 169-172.
- Barbosa CS, Pieri OS, da Silva CB, Barbosa FS 2000. Ecoepidemiologia da esquistossomose urbana na ilha de Itamaracá, estado de Pernambuco. *Rev Saude Publica* 34: 337-341.
- Barros JNF 2004. *As adversidades da urbanização turística no litoral de Ipojuca, Pernambuco*, MSc Thesis, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, **TOTAL DE PÁGINAS???????????**
- Cunha CP, Lobo RF, Araújo KC, Barbosa CS 2007. Perfil das crianças portadoras de mielorradiculopatia esquistossomótica atendidas no Hospital da Restauração, Recife, PE. *Revista de Ciência, Empreendedorismo e Tecnologia* 4: 88-95.
- Favre TC, Pieri OS, Barbosa CS 2006. Aspectos malacológicos e epidemiológicos envolvidos na transmissão da esquistossomose em Pernambuco. In SB Santos, RS Absalão (org.), *Malacologia brasileira*, Sociedade Brasileira de Malacologia, Rio de Janeiro, p. 267-276.
- Katz N, Chaves A, Pellegrino J 1972. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 14: 397-400.

- Lobo RF, Cunha CP, Barbosa CS, Araújo KC 2007. Perfil das crianças portadoras de mielorradiculopatia esquistossomótica atendidas em duas unidades de saúde do Recife. *Revista de Ciência, Empreendedorismo e Tecnologia* 4: 80-86.
- Pieri OS, Favre TC 2007. Incrementando o Programa de Controle da Esquistossomose. *Cad Saude Publica* 23: 1733-1734.
- Quinino LRM, Costa JMBS, Aguiar LR, Wanderley TNG, Barbosa CS 2009. Avaliação das atividades de rotina do Programa de Controle da Esquistossomose em municípios da região metropolitana do Recife, Pernambuco, entre 2003 e 2005. *Epidemiol Serv Saude* 18: 335-343.
- Silva PB, Pieri OS, Travassos A, Florencio L, Barbosa CS 2006. Aspectos físico-químicos e biológicos relacionados à ocorrência de *Biomphalaria glabrata* em focos litorâneos de esquistossomose em Pernambuco. *Quim Nova* 29: 901-906.
- Souza HP 2008. *Indicadores de risco para esquistossomose mansoni na localidade de Carne de Vaca, Goiana, Pernambuco: análise do padrão espacial*, MSc Thesis, Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro, 86 pp.
- Souza MA, Barbosa VS, Wanderlei TN, Barbosa CS 2008. Criadouros de *Biomphalaria*, temporários e permanentes, em Jaboatão dos Guararapes, PE. *Rev Soc Bras Med Trop* 41: 252-256.
- Standen OD 1952. Experimental infection of *Australorbis glabratus* with *Schistosoma mansoni*. I. Individual and mass infection of snails and the relationship of infection to temperature and season. *Ann Trop Med Parasitol* 46: 48-53.

ANEXO B

CONTROLE INTEGRADO DO MOLUSCO VETOR

Manuel A. Amarista Sevilla
Constança Simões Barbosa

5.1. Introdução

Atualmente sabe-se que a implementação de estratégias isoladas não tem impacto sustentável, ao longo do tempo, para o controle da esquistossomose. Como exemplo, podemos citar o uso dos moluscicidas, como estratégia para interromper a transmissão, em campanhas para o controle malacológico. Os resultados alcançados a longo prazo não foram satisfatórios e seu impacto no ambiente foi considerado extremamente negativo. A estratégia de controle acima configura uma dentre as inúmeras orientações feitas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para o controle da esquistossomose e demonstra os avanços e erros dos programas de controle dessa doença a nível mundial (Lardans V., Dissous C., 1998).

Controle da Esquistossomose e suas mudanças ao longo do tempo (OMS):

- 1950-1970 – O Japão e a Venezuela adotaram programas de controle vertical, produzindo uma redução significativa da prevalência.
- Década de 1980 – Em vários países o uso de moluscicida levou a uma diminuição rápida e eficientemente da transmissão. Nessa década registram-se avanços no diagnóstico e na quimioterapia caracterizando ações sobre a morbidade.

- Década de 1990 – Enfatiza-se a necessidade de regresso ao controle do caramujo, associado à quimioterapia, porque em algumas regiões se observou níveis de tolerância ao fármaco.
- A partir de 1995 – Ênfase sobre a natureza focal da esquistossomose com o sucesso do controle através da quimioterapia, propiciando oportunidade de intervenção específica.

Durante todo esse tempo pouco foram os investimentos na prevenção como estratégia integrada ao método de diagnóstico e a quimioterapia. Não obstante, em alguns programas isolados para o controle da esquistossomose tem integrado esses métodos e observado um impacto significativo na redução das altas taxas de morbidade (Asaolu S.O. & Ofoezie I.E., 2003). A informação acima aponta para a necessidade de estudos que permitam conhecer a relação homem-parasita-hospedeiro intermediário e seu ambiente, com destaque para as características biológicas e físico químicas dos criadouros de moluscos. Este conhecimento sobre as realidades específicas dos sítios de transmissão seriam preciosos para a compreensão da dinâmica de transmissão.

Além dos componentes bio-ecológicos a esquistossomose tem condicionantes sócio-econômicos e culturais: a pobreza, o nível cultural, modos de vida, cultura, atividades e comportamentos de risco. Seria preciso e necessário o desenvolvimento de programas de manejo integrado, que fossem parte das políticas de saúde, promovendo ações interventivas e preventivas como: informação e educação em saúde, saneamento básico e ambiental, diagnóstico precoce e quimioterapia. O foco no tratamento dos caramujos vetores poderia ser, em situações especiais, químico focal, biológico ou através do uso de produtos naturais. Estas ações devem estar em acordo com as leis ambientais vigentes.

5.2. Fundamentos de um programa de manejo integrado

Os Programas de Controle da esquistossomose mansônica, tradicionalmente tem orientado suas ações para dois componentes importantes: a. - **O controle da transmissão**; através do desenvolvimento de algumas estratégias de intervenção, como o uso de moluscidas para o controle das populações de moluscos hospedeiros intermediários. b. - **O controle da doença**; com o objetivo de reduzir a morbidade por meio do uso de fármacos (praziquantel e oxaniquine).

Ao longo do tempo se evidenciou que a implementação destas ações em alguns contextos nacionais e internacionais tem mostrado alguns avanços (redução da dimensão das áreas endêmicas e da prevalência) e alguns retrocessos (desenvolvimento da resistência aos fármacos). No caso do Brasil tem-se evidenciado uma redução das atividades operativas dos Programas de Controle e uma crise sócio-econômica que tem impulsionado a migração das populações rurais das áreas endêmicas para as principais cidades, tendo como consequência a criação de novos focos de transmissão (Barbosa C.S. et al., 1996).

Tendo em vista a ausência de novas drogas e uma vacina que se encontra em fase de desenvolvimento, destaca-se a prioridade na implementação do Controle Integrado, aliando-se o controle de vetores em conjunto com o diagnóstico precoce, terapêutica e práticas para a prevenção da infecção.

5.3. Métodos de controle integrado: vantagens e desvantagens

Educação em Saúde e Saneamento Ambiental

Alguns Programas de Controle têm adotado ações estratégicas e integradas através da Mobilização e Participação Comunitária, Educação em Saúde e Saneamento Ambiental. Essas atividades tem sido realizadas em conjunto com a quimioprofilaxia e o diagnóstico

nas comunidades das áreas endêmicas. Como resultado se conseguiu observar que estas ações conjuntas têm um impacto significativo na redução das altas taxas de morbidade (Arfaa, 1984; Jordan et al., 1975; Asaolu S.O. & Ofiozie I.E., 2003).

No entanto, se as condições ambientais continuam as mesmas a reinfecção das pessoas que vivem nas áreas endêmicas é inevitável, visto que existirão sempre indivíduos infectados e não tratados que reiniciam o ciclo de transmissão. As estratégias de controle contemporâneo devem ter sempre o homem (hospedeiro definitivo) como alvo principal, seja tratando dos indivíduos doentes seja trabalhando estratégias para barrar a contaminação fecal. Para isso são necessárias ações contínuas para sensibilizar as pessoas de localidades endêmicas no sentido de evitar que eles poluam com suas fezes os ambientes aquáticos, disseminando assim os ovos dos parasitas e infectando os moluscos hospedeiros. Estratégias de controle coerentes e integradas têm como princípio reduzir e controlar os ambientes e fatores de risco, mas para isso é preciso que as populações alvo mudem significativamente seus hábitos e comportamentos responsáveis pelo adoecer. (Asaolu S.O. & Ofiozie I.E., 2003).

O fornecimento de água potável para as comunidades carentes foi avaliado em conjunto com estratégias de educação em saúde e saneamento ambiental em localidades de Minas Gerais, obtendo-se uma redução de 54,6% sobre a intensidade da infecção (Lima et al., 1987).

Uma das limitações para a implementação de estratégias de controle integrado é seu elevado custo ao longo do tempo, porém deve se levar em consideração não somente o investimento financeiro mas o seu custo-benefício uma vez que as populações teriam uma melhor qualidade de vida e estariam livres de outras doenças de veiculação hídrica. Além disso, deve-se levar em conta que o impacto do controle integrado depende da participação e organização das comunidades e da sua disposição para mudanças que muitas vezes estão associadas a crenças e tabus (Arfaa, 1984; Kloos, 1995).

Controle Ecológico e Físico

É fundamentado na modificação do hábitat dos moluscos afetando seus parâmetros vitais. Pode consistir em secar ou modificar os corpos de água, eliminar as vegetações que servem de reservatório, ou a introdução da vegetação adversa aos moluscos. Este método pode ter alcance relativo, embora seu uso seja limitado devido ao esforço que requer e pelo fato de, em muitas ocasiões, as espécies conseguirem se adaptar as novas condições (Chrosiecchowski P., 1987).

Controle Químico

Esta baseado no uso de substâncias químicas que produzem a morte física ou reprodutiva dos moluscos. Vários agentes de controle químico foram usados em muitos programas de controle, alguns com maior ou menor sucesso : o sulfato de cobre, óxido de cálcio, fosfato de cálcio, sulfato de amônio, niclosamida, (Bayluscide), Trifenmorph, Yurimin, Nicotinilida e outros. O sucesso da aplicação de qualquer um destes compostos químicos no controle de hospedeiros intermediários está sempre dependente da relação entre a dose mínima necessária a ser aplicada e o possível dano que o mesmo composto pode causar no ecossistema (Chrosiecchowski P., 1987; Pointier et al., 1994). Devido ao sério impacto ambiental causado muitos destes moluscicidas foram descartados e outros só devem ser usados só em condições extremas.

Produtos Naturais

Como alternativa ao uso de substâncias sintéticas muitas pesquisas procuraram compostos de origem natural que tivessem ação moluscicida. Na década de 80 e 90 houve um aumento no uso de substâncias obtidas a partir de extratos de plantas, usando espécies autóctones (Mott, 1987; Ferrer y Díaz, 1994) com o fundamento que as substâncias de origem natural produzem danos menores ao meio ambiente.

Existem muitas publicações científicas sobre o uso de moluscidas naturais embora sejam muito poucos os estudos sobre a sua aplicação em condições de campo. (Anthony J.P. et al., 2005). Diante da diversidade dos recursos vegetais poucos são os conhecimentos sobre a antibiose de plantas superiores (Ieven et al., 1979) e é razoável pensar que existe uma alta probabilidade de encontrar agentes moluscidas em nossas plantas. É provável que nas famílias de tradição etnobotânica identificadas na área amazônica: Bignoniaceae, Chrysobalanaceae, Gesneriaceae, Icacinaceae, Melastomataceae, Monimiaceae e Vochoyseaceae (Delascio, 1992), existam princípios que tenham atividade biológica sobre o *Biomphalaria*.

Nas plantas moluscidas pesquisadas tem-se encontrado algumas importantes para o controle das populações dos hospedeiros intermediários (Mott, 1987). Entre estas estão *Sapindus saponaria*. As sementes dessa árvore caem na água e liberam substâncias detergentes naturais, as saponinas, que têm efeito tóxico sobre os caramujos *Biomphalaria* (Torrealba et al., 1953). Na África se identificou outra planta, *Phytolacca dodecandra*, cujos extratos do fruto atuam também com sucesso sobre os hospedeiros intermediários (Monkiedge et al., 1991). Os princípios ativos da *Phytolacca dodecandra* são também miracidicidas (Madhina & Shiff, 1996).

Os ácidos anacárdicos presentes na casca do fruto do *Anacardium occidentale* são moluscidas efetivos e têm sido usados como agentes de controle das populações de moluscos no campo (Pereira & Souza, 1974; Sullivan et al., 1982). Estudos no campo têm mostrado que a planta *Ambrosia maritima* é um excelente moluscida (El-Sawy et al., 1984). Extratos aquosos de *Rheum palmatum* e *Rumex dentatus* (Polygonaceae) da China mostraram atividade moluscida contra os caramujos da espécie *Oncomelania hupensis*, *B. glabrata* e *Bulinus globosus*, vetores de *S. japonicum*, *S. mansoni* e *S. haematobium*. A atividade moluscida para essas espécies vetorais foi correlacionada com a presença de antraquinonas (Liu et al., 1997).

Por outro lado, os extratos das sementes *Jatropha curcas* (de Mali) mostraram atividade moluscida ao 0.001% (10 p.p.m.) contra *B. glabrata* e *O. hupensis*. Esse extrato foi associado com ésteres forbólicos do óleo e o seu uso pode ser considerado para o controle da esquistossomose (Liu et al., 1997). O látex de *Euphorbia milii* contém milliaminas moluscidas ativos a uma concentração de 2.5 µg/l (Zani et al., 1993) e o uso da *Euphorbia splendens* foi proposto para ser integrado aos programas de controle da esquistossomose do Brasil (Mott, 1987).

O manejo dos moluscos representa um componente adicional no controle da transmissão da doença sendo importante estimular e explorar as potencialidades dos diferentes e novos agentes naturais.

Controle Biológico

Forma de controle centrada em outras espécies animais para reduzir as densidades dos hospedeiros intermediários. Há muitas pesquisas que mostram a efetividade deste método usando competidores, predadores e parasitas.

Como predadores detasca-se as espécies da família Ampullariidae, que são capazes de devorar tanto as oviposições como caramujos jovens e adultos de *Biomphalaria* (Demian & Luft, 1964; Paulinyi & Paulini, 1972); também foi sugerido o uso de peixes (*Tilapia zuly*) como predadores (Coates & Redding-Coates, 1981).

Entre as espécies competidoras tem-se sugerido uso da família Thiariidae (*Tarebia granifera*, *Melanooides tuberculata*), porque as mesmas reduzem as populações dos hospedeiros intermediários nos ambientes estáveis (Pointier & McCullough, 1989; Pointier et al., 2005). Estes tíarideos possuem altas taxas de sobrevivência e fecundidade (por serem espécies partenogênicas e ovovivíparas), alcançando densidades populacionais que ocasionam o deslocamento de outros caramujos (Pointier et al., 2005). O uso destes competidores é pouco efetivo nos habitats mais dinâmicos, como poças ou riachos temporários, porque nesses criadouros seu valor adaptativo é muito baixo. Na maioria dos pulmonados de água

doce acontece o contrário, porque eles têm um valor adaptativo mais alto, menor longevidade, maturidade sexual precoce e taxa de fecundidade mais alta, ademais tem pouca dependência das condições ambientais (Pointier & McCullough, 1989). Outro molusco sugerido como competidor foi o planorbídeo *B. straminea* (cepa resistente) que não mostrou efetividade em campo (Pointier J.P. et al., 1994). *Helisoma duryi* mostrou, em condição de laboratório, sua capacidade de competir ao deslocar as populações de *Biomphalaria* (Madsen, 1984), embora outros estudos tenham descartado sua aplicação nas condições do campo.

Outras formas de controle biológico implicam também no uso de **trematodas parasitas** como alternativa contra o uso dos moluscidas químicos (Pointier et al., 1994). A idéia de utilizar os trematodas esterilizantes como meio de controle biológico surgiu no final do século XIX quando suas propriedades esterilizantes foram evidenciadas. Atualmente se tem muita informação sobre a ação esterilizante das espécies da classe trematoda que desenvolvem a fase larval de redia (Jourdane & Kulo, 1982; Jourdane, 1983; Mouahid & Moné, 1990; Amarista, 1997). Até o presente só uma experiência de campo foi realizada para avaliar a eficácia deste tipo de controle. (Nassi et al., 1979). Durante 10 meses, 8 milhões de ovos do trematodo local *Ribeiroia marini guadalupensis*, foi introduzindo em uma Lagoa de Guadalupe e 01 ano depois se observou que a população de caramujos baixou em 93%, mais 01 estes desapareceram da Lagoa. Após a intervenção os moluscos iniciaram de novo a colonização dos habitats e 04 anos mais tarde se observou a recolonização total (Pointier et al., 1981). Isto mostra que a utilização dos trematodos não é efetiva até que se conheça a relação entre o número de ovos que tem que semear e o número de moluscos presentes nos lugares da transmissão (Pointier et al., 1994).

Outra experiência de laboratório com o uso de agente biológico foi realizada em 1996 para avaliar o potencial de uma espécie de *Echinostoma* encontrada em um lago na Venezuela. Os resultados mostraram: a.- observou-se que a infecção dura 45 dias

no hospedeiro definitivo e logo acontece uma desparasitação natural; b.- nos hospedeiros intermediários encontrou-se que a dose de 8-10 miracídios permite uma taxa de infecção experimental de 100%, os moluscos parasitados nunca se reproduzem e tem uma taxa de sobrevivência menor em relação ao grupo controle (Amarista M., 1997).

Na natureza infecções mistas *Echinostoma-Schistosoma* podem ser observadas e encontrou-se que o gênero *Echinostoma* exerce um efeito de dominância sobre o gênero *Schistosoma*. (Lie, 1966; 1969; 1973). Outra pesquisa evidenciou o efeito de dominância em condições naturais (Mouahid et Moné, 1990).

O controle biológico usando trematodos poderia ser incorporado aos programas de integrados diante das vantagens:

1. um custo econômico moderado, necessitando mão de obra para a colocação dos competidores nos habitats dos moluscos do gênero *Biomphalaria*;
2. preservação do ambiente, graças a especificidade deste gênero sobre seu hospedeiro intermediário; e
3. efeito de interferência (predação), quando acontecem infecções mistas *Echinostoma-Schistosoma* (Combes, 1983).

Outros grupos taxonômicos que têm sido avaliadas como **agentes com potencial no controle biológico, são:**

- a. *Belostoma boscii*, que mostrou efetividade em condições de laboratório porque se alimenta dos caramujos em todas suas etapas de vida podendo sobreviver \pm 7 meses.
- b. *Helobdella puntatolineata* (sanguessuga), esta espécie tem um regime alimentício variado, em laboratório e no campo é um eficiente predador.
- c. Crustáceos (*Chlamydotthea unispinosa* e *Macrobrachium faustinum*), aves (*Butorides virescens* e *Tringa flavipes*) e mamíferos (*Rattus rattus* e *Rattus norvegicus*). Essas espécies têm mostrado pouca eficiência como predadores em condições de laboratório e campo (Pointier J.P. & Deplanque A., 1976).

5.4. Quais são os riscos, custos e benefícios do controle biológico?

O desenvolvimento de um Programa de Manejo Integrado prevê a prática concomitante de várias estratégias de controle: educação em saúde, saneamento básico e ambiental, controle ecológico e físico, controle químico focal, quimioterapia e controle biológico. É importante se levar em consideração que o **Manejo Integrado de Hospedeiros Intermediários** é uma metodologia que interfere no ambiente dos hospedeiros e na sua dinâmica populacional, devendo se avaliar com cautela as consequências ecológicas, econômicas e sociais que podem resultar desse manejo. (Amarista M., Marcano R., 2004, comunicação pessoal). É preciso dizer que a todo tempo há riscos quando se avalia o potencial dos agentes nas condições do laboratório e nas condições semi-controladas de campo (Simberloff D. & Stiling P., 1996), porque um desequilíbrio no ecossistema pode causar sérios problemas, embora estes riscos sejam menores na medida que se apliquem os protocolos exigidos pela O.M.S (Combes, 1982). A busca de agentes de controle biológico deve ser integrada aos programas de controle da esquistossomose como medida alternativa ao controle químico no qual o impacto sobre o ambiente é considerável (Pointier et al., 1994).

Com relação aos cuidados com este tipo de pesquisa recomenda-se que a mesma deve se pautar pela responsabilidade social e científica para evitar riscos como:

- Mudança da fitness ou valor reprodutivo do agente utilizado para o controle.
- A estratégia pode não ter impacto ao longo do tempo.
- As espécies selecionadas como controle biológico podem se tornar susceptíveis de serem parasitadas e transmitir outras doenças.
- Extinção de algumas espécies da fauna local.
- Impacto negativo na agricultura com consequência na economia.
- Impacto negativo na saúde pública.

Benefícios:

- Redução da transmissão da esquistossomose.
 - Não deve provocar nenhuma perturbação ou desequilíbrio ambiental.
 - Estratégia simples de impacto significativo sobre os vetores, de baixo custo econômico (Carruthers R. I. & D'Antonio C. M., 2005).
- Entre os fatores que devem ser levados em conta para definir as ações específicas de controle, a Organização Mundial da Saúde (1994) faz algumas recomendações:
- Definição das verdadeiras necessidades da comunidade.
 - O tipo de esquistossomose existente, a prevalência e a gravidade da infestação, assim como a prevalência e a gravidade da morbidade.
 - As características ecológicas, ambientais e epidemiológicas.
 - O acesso ao atendimento primário de saúde.
 - A capacidade de controle central, municipal e o suporte técnico
 - Esforços intersetoriais, enfatizando a orientação escolar, o suprimento de água tratada, as condições de higiene, o controle ambiental e a participação da comunidade.

5. Bibliografia

- Amarista M., 1997. Variations spatio-temporelles des mollusques d'importance médicale dans le lac de Valencia, Vénézuéla, et perspectives de contrôle biologique. Tesis de maestria. Francia-Montpellier. Faculte de Science. 30 pp.
- Anthony J-P., Fyfe L. & Smith., 2005. Plant active components-a resource for aniparasitic agents?. Trends in Parasitology. Vol. 21 (Nº 10): 462-468.

- Arfaa F., 1984. Selective primary health care: strategies for control of disease in the developing world. XII. Ascariasis and trichuriasis. *Rev. Infect. Dis.* 6: 364-373.
- Asaolu S.O. & Ofoezie, 2003. The role of health education and sanitation in the control of helminth infections. *Acta tropica.* 86:283-294.
- Barbosa C.S., 1996. Esquistossomose: reprodução e expansão da endemia no Estado de Pernambuco. *Rev. Saúde Pública.* 30: 609-616.
- Barbosa C.S. & Pieri O.S., 2000. Aspectos epidemiológicos e malacológicos da esquistossomose mansônica na ilha de Itamaraca, Pernambuco. *Rev. Saúde Pública.* 34: 33-41.
- Barbosa C.S., Araújo K.C., Favre T., & Pieri O.S., 2004. Spatial distribution of schistosomiasis on Itamaraca Island Pernambuco, Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* Vol 99 (suppl D): 79-83.
- Burlandy-Soares L. C., Dias Cândido de Souza L.; Kanamura h.Y., Oliveira E.J., & Ciaravolo R.M., 2003. Schistosomiasis mansoni: follow-up of control program based on parasitologic and serologic methods in a Brazilian community of low endemicity. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* Vol.98 (no.6):190-1999.
- Carruthers R. I. & D'Antonio C. M., 2005. Science and Decision Making in Biological Control of Weeds: Benefits and Risks of Biological Control. Vol 35, (3):181-388.
- Chiffi P.P. & Waldman E.A., 1988. Aspectos particulares do comportamento epidemiológico da esquistossomose mansônica no Estado de São Paulo. *Cadernos de Saúde Pública*, RJ., 4(3): 257-275.
- Coates D. & Redding-Coates T.A., 1981, Ecological problems associated with irrigation canals in the Sudan with particular reference to the spread Bilharziasis, Malaria and aquatic weeds and ameliorative role of fishes. *International Journal of Environmental Studies.* 16 (3/4): 207-212
- Combes, C., 1982. Trematodos: antagonism. Between species and sterilizing effects on snail in biological control. *Parasitology.* 84:151-175.
- Combes, C., 1983. Usage des trématodes stérilisantes-dominants pour le de certaines maladies parasitaires. *Etat des recherches. Symbioses.* 15 (2): 93-125.
- Chrosiecowski, P., 1987. Problema de la fascioliasis en Venezuela: su aspecto malacológico. *Boletín de la Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental*, 27: 53-58.
- Delascio F., 1992. Vegetación etnobotánica del Valle de Culebra (*Mawadina jodo*). *Estado Amazonas. Venezuela Acta Terramaris.* 5: 37 pp.
- Demian, E.S. & Lufty, R.G., 1964. Prospects of use of Marisa cornuarietis in the biological control of Lymnaea cailliaudi in the U.A.R. *Proc. Egyptian Academic Sciences.*, 18: 46-53.
- El-Sawy, M.F., Duncan, J., Marshall, T.F.D., Shehata, M.A.R. & Brown, N., 1984. The molluscicidal properties of *Ambrosia maritima* L. (Compositae). 2. Results from a field trial using dry plant material. *Tropenmed. Parasitol.*, 35: 100-104.
- EngelS D., Chitsulo A., Montresor L., & Savioli., 2002. The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and reserch. *Acta tropical.* 82: 139-146.
- Favre T., Pieri O., Barbosa C.S., & Beckl, 2001. Avaliação das ações de controle da esquistossomose implementadas entre 1997 e 1996 na área endêmica de Pernambuco, Brasil. *Rev. Sov. Bras. Med. Trop.* 34 : 569-576.
- Favre T.C., Pieri O.S., Zani L.C., Ferreira, Domas G.G., & Barbosa C.S., 2002. A longitudinal study on the natural infection of *Biomphalaria stramineab* and *B. glabrata* by *Schistosoma*

- mansoni* in an endemic area of schistosomiasis in Pernambuco, Brasil. Men. Inst. Oswaldo Cruz. Vol 97 (4): 465-475.
- Ferrer J.R. & Díaz R., 1994. Estudio de la actividad molusquicida de diferentes plantas sobre *Biomphalaria havanensis*, hospederio intermediario potencial de esquistosomiasis en Cuba. Rev. Cub. Med. Trop., 46:103-107.
- Leven, M., Van Den Berghe, D.A., Mertens, F., Vlietinck, A. & Lammens, E., 1979. Screening of higher plants for biological activities. I. Antimicrobial activity. Planta Med. 36: 311-321.
- Jordan, P., Woodstock, L., Unrau, G.O., & Cook, J.A., 1975. Control of *Schistosoma mansoni* transmission by provision of domestic water supplies. Bull. WHO 52: 9-20
- Jourdan, J. & Kulo, S.D., 1982. Perspectives d'utilisation de *Echinostoma togoensis* Jourdan & Kulo, 1981 dans le contrôle biologique de la bilharziose intestinale en Afrique. Annales de Parasitologie, 57(5):443-451.
- Jourdan, J., 1983. Effet des hyperinfestations par *Echinostoma togoensis*. Annales de Parasitologie. 58: 103 - 108.
- Kloos, H., 1995. Human behavior, health education and schistosomiasis control: a review. Soc. Sci. Med. 40, 1497/1511.
- Lardans V. & Dissous C., 1998. Snail control strategies for reduction of schistosomiasis transmission. Parasitology today. Vol. 14(N°10):413-417.
- Lie K.J., 1966. Antagonistic Interaction between *Schistosoma mansoni* sporocysts and *Echinostoma* Rediae in the Snail *Australarbis glabratus*. Nature, 211 (5054): 1213-1215.
- Lie K.J., 1969. A possible biological control of schistosomiasis and other trematodes in snail. In : "Proceeding 4th Southast Asian Seminar on Parasitology and tropical Medicine", Schistosomiasis and other Snail-Transmitted Helminthiasis (De. C. Hariasuta), SEAMEC, Bangkok: 131-141.
- Lie K.J., 1973. Interference in the dominance of one larval trematode over another by a third species. Southeast Asian journal of tropical Medicine and Public Health, 4: 278-279.
- Lima, E., Costa, M.F.F., Magalhaes, M.H.A., Rocha, R.S., Antunes, & C.M.F., Katz, N., 1987. Water-contact patterns and socioeconomic variables in the epidemiology of Schistosomiasis mansoni in an endemic area in Brazil. Bull. WHO 65: 57-66.
- Liu, S.Y., Sporer, F., Wink, M., Jourdan, J., Li, Y.L. & Ruppel, A., 1997. Anthraquinones in *Rheum palmatum* and *Rumex dentatus* (Polygonaceae), and phorbol esters in *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae) with molluscicidal activity against the schistosome vector snails *Oncomelania*, *Biomphalaria* and *Bulinus*. Trop. Med. Int. Health 2: 179-188.
- Madhina, D. & Schiff, C., 1996. Prevention of snail miracidia interactions using *Phytolacca dodecandra* (L'Herit) (endod) as a miracidicide: an alternative approach to the focal control of schistosomiasis. Trop. Med. Int. Health, 1: 221-226.
- Madsen, H., 1984. The effect of water conditions by either *Helisoma duryi* or *Biomphalaria camerunensis* on the growth and reproduction of the juvenile *B. camerunensis* (Pulmonata: Planorbidae). J. Appl. Ecology. 21: 757-772.
- Monkiedge, A., Anderson, A.C. & Englande, A.J., 1991. Acute toxicity of *Phytolacca dodecandra* (Endod-S) and niclosamide to snails, *Schistosoma mansoni* cercariae, tilapia fish, and soil microorganisms. Environ. Toxicol. Water Qual. 6: 405-413
- Mott, Ke, 1987. Plant Moluscicides. W. H. O. 326 pp.
- Mouahid A. & Moné H., 1990 Interference of *Echinoparyphium elegans* with the host-parasite system *Bulinus truncatus* - *Schistosoma bovis* in natural conditions. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 84: 341- 348.

- Nassi, H., Pointier, J.P. & Golvan, Y.J., 1979. Bilan d'un essai de contrôle de *Biomphalaria glabrata* en Guadeloupe à l'aide d'un trématode stérilisant. *Annales de Parasitologie*, 54(2): 185-192.
- Paulinyi, H.M. & Paulini E., 1972. Laboratory observations on the biological control of *Biomphalaria glabrata* by a species of Pomacea (Ampullariidae). *Bull. WHO*. 46: 243-247.
- Pereira, J.P. & Souza, C.P. 1974. Ensaio preliminar com "*Anacardium occidentale*" como molluscicida. *Ciencia e Cultura*, 26: 1054-1057.
- Passos A.D.C., & Amaral R.S., 1998. Esquistossomose mansônica; aspectos epidemiológicos e de controle. *Rev Soc Bras Med Trop* 31 (Supl. II): 61-74.
- Pointier J.P. & Deplanque A., 1976. Bulletin de la Societe Scientifique Medica et Vétérinaire Comparée, Lyon, 78, n° 6. pp: 319-331.
- Pointier J.P, Toffart J.L & Nassi H., 1981. Recolonisation d'un mare de Guadeloupe (Antilles Françaises) par une population de *Biomphalaria glabrata* à la suite d'un essai de contrôle biologique. *Haliotis*, 11: 197 - 200.
- Pointier J.P. & Mccullough F, 1989, Biological control of the snail hosts of *Schistosoma mansoni* in the Caribbean area using *Thiara* spp. *Acta Tropica*. 46: 147-155.
- Pointier, Jp. Incani, R.N, Balzan, C., Chrosciechowski, P., 1994. El control biológico de los moluscos hospederos intermediarios de la esquistossomiasis. Capítulo mexicano de la Sociedad Internacional de Malacología Médica y Aplicada. p. 19 - 24.
- Pointier J.P, Patrice D. & Jarne P., 2005. Biological invasions: the case of planorbid snails. *Journal of Helminthology*. 79: 249-256
- Rey Luis., 1991. *Parasitología*. (2da Ed). Edit. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro Brasil. pp 731.
- Strickland Thomas G., 2000. *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases*. 8va Ed. W.B.Saunders Company. pp. 1192.
- Simberloff D. & Stiling P., 1996. Risks of species introduced for biological control. *Biological Conservation*. 78:185-192.
- Sullivan, J.T., Richard, C.S., Lloyd, H.A. & Krishna, G., 1982. Anacardic acid: molluscicide in cashew nut shell liquid. *Planta Med*. 44: 175.
- Torrealba, J.F., Scorza, J.V., Sanabria, M.S., Vazquez, A.D., Ramos, B.I., Riccardi, B. & Jordan, L.S., 1953. Nota preliminar sobre la acción malaquicida del fruto del paraparo (*Sapindus saponaria*). *Gaceta Médica*, 61: 299-307.
- Théron A & Pointier J.P., 1995. Ecology, dynamics, genetics and divergence of trematode populations in heterogeneous environments: the model of *Schistosoma mansoni* in insular focus of Guadalupe. *Reserch and reviews in Parasitology*. 55 (1): 49-64.
- Zani, C.L., Marston, A., Hamburger, M. & Hostettman, K., 1993. Molluscicidal milliamines from *Euphorbia milii* var. *hislopii*. *Phytochemistry*, 34: 89-95.
- World Health Organization. 1997. *Schistosomiasis*. Aide Memore. 115: 1-4.
- Organização Mundial da Saúde, 1994. O controle da equistossomose: segundo relatório do comitê de especialistas da OMS. Who Technical Report Serie N° 830. pp. 110.