

Centro de Pesquisas René Rachou
Fundação Oswaldo Cruz

Mestrado em Biologia Celular e Molecular

Estudo dos hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni* no distrito de
Ravena, município de Sabará, MG

por

Pollanah Martins Lira Moreira

Belo Horizonte
Junho de 2006



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas René Rachou

Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Estudo dos hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni* no distrito de
Ravena, município de Sabará, MG

Pollanah Martins Lira Moreira

Dissertação apresentada com vistas à obtenção do Título de Mestre em Ciências
da Saúde na área de Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Roberta Lima Caldeira

Co-Orientador: Omar dos Santos Carvalho

Junho

2006



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas René Rachou

Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Esta dissertação intitulada:

Estudo dos hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni* no distrito de
Ravena, município de Sabará, MG

apresentada por:

Pollanah Martins Lira Moreira

foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Dra. Tereza Cristina Favre

Prof. Dr. Guilherme Corrêa Oliveira

Dissertação defendida e aprovada em 05 de junho de 2006.

**Dedico a minha mãe e a minha avó,
que sempre foram meus exemplos
de amor, amizade e força. Ao André,
meu amor, amigo e companheiro.**

**“Se as coisas são inatingíveis... ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
A presença distante das estrelas!”**

Mário Quintana

Agradecimentos

A minha mãe e a minha avó, que muito batalharam e de algumas coisas se privaram para que eu pudesse ter uma boa educação. Também pelo apoio e incentivo, mesmo nos momentos mais difíceis.

Aos meus tios Jairo e Adília, por terem financiado meus estudos na faculdade, a minha eterna gratidão.

Ao meu marido André, pelo amor, carinho, companheirismo e apoio em todas as horas. Também por ter sido paciente nos momentos em que eu não conseguia ser.

A Dr. Roberta Lima Caldeira, pela amizade, pelo exemplo de dedicação ao trabalho e, sobretudo pela orientação desde a iniciação científica.

Ao Dr. Omar dos Santos Carvalho, pela orientação, confiança e também pelas oportunidades que me foram oferecidas.

Ao Zezinho, pela ajuda nas coletas dos caramujos e com quem muito pude aprender.

À equipe do Moluscário, Delza, Sueleny e Dílcia, pela ajuda na criação e infecção dos caramujos e também com quem muito aprendi.

À Liana, pela amizade, conselhos, incentivos e também pelas valiosas sugestões.

Ao Dr. Cristiano, pelo apoio e sugestões.

À Simone, pela ajuda, amizade e incentivo. Também por ter se mostrado prestativa em todos os momentos em que precisei.

À Amanda, que também me ajudou em diversos momentos.

Aos motoristas Toninho, Cláudio e Ronaldo, que sempre foram educados e dispostos a ajudar.

Aos meus amigos Kelly e Ronaldo, pela amizade, conselhos e pelos ótimos momentos que vivemos juntos.

À minha querida amiga Sthefane, pela amizade, incentivo e companheirismo. Sei que convivemos por pouco tempo, mas parece que nos conhecemos a vida toda.

Aos colegas do Laboratório de Helmintoses Intestinais, Cristiane Lafetá, Davidson, Fabiana, Felipe, Graciella, Larissa, Paula, Sandra Carvalho e Tatiana. Especialmente a Sandra Ribeiro, pela ajuda na realização de alguns experimentos.

Às amigas: Ana Bahia, Ana Carolina, Fernanda, Fabrícia, Karine, Maria Cláudia e Paola pelo companheirismo, incentivo e momentos agradáveis que passamos juntas.

Às minhas amigas “Pildas”, pela amizade e momentos divertidos que temos vivido desde a faculdade. Sei que posso sempre contar com vocês.

A todos os meus familiares que me incentivaram e me ajudaram de alguma forma.

À Equipe do Biotério e ao Segemar, pela ajuda e colaboração sempre que necessário.

À equipe do serviço de informática, em especial ao Edmar.

À Pós-Graduação do Centro de Pesquisas René Rachou, em especial a Cristiane e a Neide, sempre muito atenciosas e prestativas.

À Carolina da Secretaria Geral, também sempre muito prestativa.

Ao Centro de Pesquisas René Rachou e a Fundação Oswaldo Cruz pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	III
LISTA DE TABELAS.....	V
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VI
RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
1 – INTRODUÇÃO.....	01
1.1 - A esquistossomose.....	02
1.2 - O ciclo de vida do <i>S. mansoni</i>	04
1.3 – Áreas endêmicas.....	06
1.3.1 - Ravena, Sabará/MG.....	08
1.4 - Hospedeiros intermediários.....	09
1.4.1 - Considerações gerais.....	09
1.4.2 – Biologia.....	10
1.4.3 – Suscetibilidade.....	11
1.4.4 - <i>Biomphalaria tenagophila</i>	12
1.4.5 - Identificação morfológica.....	13
1.5 - Técnicas moleculares.....	17
1.5.1 - Identificação molecular.....	17
1.5.2 - Variabilidade genética.....	20
2 – OBJETIVO.....	21
2.1 – Geral.....	22
2.2 – Específicos.....	22
3 – METODOLOGIA.....	23
3.1 - Área estudada.....	24
3.2 - Coleta de moluscos.....	24
3.3 - Exame dos moluscos.....	30
3.3.1 - Por exposição à luz artificial.....	30
3.3.2 - Por esmagamento.....	30
3.4 - Identificação morfológica.....	30
3.5 - Avaliação de suscetibilidade de <i>B. tenagophila</i>	30
3.5.1 - Obtenção de molusco F1.....	30
3.5.2 - Obtenção das cepas SJ de <i>S. mansoni</i>	31

3.5.3 - Infecção dos moluscos.....	31
3.6 - Estudos moleculares.....	32
3.6.1 - Extração do DNA dos moluscos.....	32
3.6.2 - Identificação Molecular	32
3.6.2.1 - PCR específico.....	32
3.6.2.2 - Produção dos perfis de restrição da região ITS.....	33
3.6.3 - Estudo de variabilidade genética.....	33
3.6.3.1 – RAPD.....	34
4 - RESULTADOS.....	36
4.1 - Levantamento malacológico.....	37
4.2 - Exame de moluscos.....	37
4.3 - Identificação morfológica.....	41
4.4 - Identificação molecular.....	41
4.5 - Infecção experimental.....	43
4.5 – Variabilidade genética.....	45
4.5.1 - Intrapopulacional.....	45
4.5.2 - Interpopulacional.....	52
5 – DISCUSSÃO.....	57
6 – CONCLUSÕES.....	68
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Desenho esquemático do ciclo de vida do <i>S. mansoni</i>	05
FIGURA 2: Distribuição da esquistossomose no Brasil.....	07
FIGURA 3: Distribuição geográfica das espécies hospedeiras intermediárias do <i>Schistosoma mansoni</i> na América do Sul.....	10
FIGURA 4: Morfologia da concha de <i>Biomphalaria</i>	14
FIGURA 5: Vista lateral dos órgãos de <i>Biomphalaria glabrata</i>	15
FIGURA 6: Caracteres morfológicos utilizados para a identificação de <i>B. glabrata</i>	16
FIGURA 7: Caracteres morfológicos utilizados para a identificação de <i>B. tenagophila</i>	16
FIGURA 8: Desenho esquemático do gene do RNA ribossomal.....	19
FIGURA 9: Diagrama representativo dos perfis espécie-específicos das dez espécies e uma sub-espécie brasileiras do gênero <i>Biomphalaria</i>	19
FIGURA 10: Rio Vermelho.....	25
FIGURA 11: Córrego Florêncio.....	25
FIGURA 12: Poço artesiano.....	26
FIGURA 13: Lagoa da Cotochés.....	26
FIGURA 14: Córrego Lavapés.....	27
FIGURA 15: Vala 1.....	27
FIGURA 16: Lagoa Nova.....	28
FIGURA 17: Corguinho.....	28
FIGURA 18: Vala da Bomba.....	29
FIGURA 19: Desenho ilustrativo das diferentes cercárias encontradas.....	38
FIGURA 20: Gel de poliacrilamida 6% mostrando o perfis de PCR-RFLP obtidos pela digestão da região ITS de DNAr com a enzima <i>DdeI</i> dos moluscos provenientes do sete pontos de coleta em Ravena (Sabará-MG).....	42
FIGURA 21: Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata mostrando os perfis de RAPD obtidos pelos iniciadores 3302, 3304 e 3307 dos indivíduos de <i>B. tenagophila</i> do Taim/RS.....	47
FIGURA 22: Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata mostrando os perfis de RAPD obtidos pelos iniciadores 3302, 3304 e 3307 dos indivíduos de <i>B. tenagophila</i> da Lagoa da Cotochés/MG.....	48

FIGURA 23: Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata mostrando os perfis de RAPD obtidos pelos iniciadores 3302, 3304 e 3307 dos indivíduos de <i>B. tenagophila</i> do Córrego Florêncio/MG.....	49
FIGURA 24: Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata mostrando os perfis de RAPD obtidos pelos iniciadores 3302, 3304 e 3307 dos indivíduos de <i>B. tenagophila</i> do Rio Vermelho/MG.....	50
FIGURA 25: Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata mostrando os perfis de RAPD obtidos pelos iniciadores 3302, 3304 e 3307 dos indivíduos de <i>B. tenagophila</i> de Anchieta/ES.....	51
FIGURA 26: Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata mostrando os perfis de RAPD obtidos pelo iniciador 3302 dos indivíduos de <i>B. tenagophila</i> do estudo interpopulacional.....	53
FIGURA 27: Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata mostrando os perfis de RAPD obtidos pelo iniciador 3304 dos indivíduos de <i>B. tenagophila</i> do estudo interpopulacional.....	54
FIGURA 28: Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata mostrando os perfis de RAPD obtidos pelo iniciador 3307 dos indivíduos de <i>B. tenagophila</i> do estudo interpopulacional.....	55
FIGURA 29: Dendograma Neighbor-Joining obtido a partir da análise dos perfis de RAPD de todas as populações de <i>B. tenagophila</i> , produzidos com os iniciadores 3302, 3304 e 3307.....	56
FIGURA 30: Dados pluviométricos de Belo Horizonte (2005).....	60
FIGURA 31: Dados pluviométricos do estado de Pernambuco (1955 a 1960).....	60
FIGURA 32: Dados pluviométricos de Belo Horizonte (1980).....	61

LITA DE TABELAS

TABELA 1: Prevalência da esquistossomose no Brasil, por Estado, considerando o Programa de Controle nos períodos de 1980-1989 e 1990-2002.....	03
TABELA 2: Localidades, número de exemplares e códigos das populações de <i>B.tenagophila</i> utilizadas no estudo de variabilidade genética.....	33
TABELA 3: Protocolo utilizado na reação de RAPD.....	35
TABELA 4: Número de exemplares de <i>Biomphalaria</i> coletados de acordo com a coleção hídrica e o mês (2005).....	39
TABELA 5: Tipos de cercárias encontradas durante o exame dos moluscos coletados em Ravena.....	40
TABELA 6: Infecção experimental de <i>B. tenagophila</i> utilizando miracídios de <i>S. mansoni</i> da cepa SJ.....	44
TABELA 7: População estudada, número de bandas analisadas, bandas polimórficas, bandas monomórficas e tamanho dos fragmentos produzidos pelo iniciador 3302.....	45
TABELA 8: População estudada, número de bandas analisadas, bandas polimórficas, bandas monomórficas e tamanho dos fragmentos produzidos pelo iniciador 3304.....	46
TABELA 9: População estudada, número de bandas analisadas, bandas polimórficas, bandas monomórficas e tamanho dos fragmentos produzidos pelo iniciador 3307.....	46
TABELA 10: Número de bandas analisadas, bandas polimórficas, bandas monomórficas e tamanho dos fragmentos produzidos pelos iniciadores 3302, 3304 e 3307 respectivamente.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS

- AP-PCR** - arbitrarily primed polymerase chain reaction; reação em cadeia da polimerase, utilizando iniciadores arbitrários
- DNA** - deoxyribonucleic acid; ácido desoxirribonucleico
- dNTP** - deoxynucleotide triphosphate; deoxinucleotídeo trifosfato
- EDTA** - ethylenediaminetetracetic acid; ácido etilenodiaminotetracético
- ITS** - internal transcribed spacer; espaçadores transcritos internos
- Kb**- Kilobases; unidade correspondente a mil pares de bases
- OTUs** - operational taxonomic unit; unidades taxonômicas operacionais
- pb**- pares de bases
- PCR** - polymerase chain reaction; reação em cadeia da polimerase
- RAPD** - randomly amplified polymorphic DNA; polimorfismo de DNA amplificado aleatoriamente
- RFLPs** - restriction fragments length polymorphisms; polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição
- rRNA** - ribosomal ribonucleic acid; ácido ribonucleico ribossomal.
- Taq**- DNA polimerase termostável derivada da bactéria *Thermus aquaticus*
- SSR-PCR** - simple sequence repeat – anchored PCR; PCR ancorado a repetições de seqüências simples

RESUMO

A esquistossomose é uma das parasitoses mais prevalentes no mundo. Este fato deve-se principalmente a dispersão dos hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni*. De fato, após o registro de *Biomphalaria glabrata* no estado do Rio Grande do Sul seguiu-se à detecção do primeiro foco da esquistossomose mansoni no estado. Em virtude disso é fundamental conhecer a distribuição geográfica desses hospedeiros intermediários. No intuito de rever a distribuição desses moluscos no distrito de Ravena (Sabará/MG), várias áreas pesquisadas em 1980 foram revisitadas. Naquela época a prevalência da esquistossomose era de 36,7% e os moluscos encontrados foram *B. tenagophila* e *B. glabrata*. Entre estes últimos, 1,5% dos exemplares encontravam-se parasitados por *S. mansoni* e nenhum exemplar de *B. tenagophila* estava eliminando cercárias desse parasito. No presente estudo, foram capturados 3.451 moluscos, examinados por exposição à luz artificial e identificados através da morfologia e da técnica de PCR-RFLP. Os moluscos foram identificados como *B. glabrata* (357) e *B. tenagophila* (3.094). Todos estavam negativos para *S. mansoni*. Testes de suscetibilidade foram realizados utilizando a cepa SJ de *S. mansoni* em três populações de *B. tenagophila* da localidade. Taxas de infecção de 3,8, 4,0 e 5,0% foram obtidas, superiores ao relatado em estudos anteriores com *B. tenagophila* do distrito. Para avaliar a variabilidade genética dessas três populações utilizou-se a técnica de RAPD com três iniciadores: 3302, 3304 e 3307. Além disso, esses perfis de RAPDs foram comparados aos perfis de duas outras populações de *B. tenagophila*. Uma população oriunda do Taim/RS considerada resistente ao *S. mansoni* e outra, oriunda de Anchieta/ES, que até o momento, mostrou-se refratária às cepas SJ e LE. Nas cinco populações verificou-se uma baixa variabilidade genética intrapopulacional e uma alta variabilidade interpopulacional. As informações obtidas neste estudo mostraram que os hospedeiros intermediários permanecem no distrito de Ravena. Ocorreu uma substituição de *B. glabrata* por *B. tenagophila*. Apesar dos moluscos coletados estarem negativos para *S. mansoni*, isto não implica que o distrito esteja livre da parasitose. Esta é uma área que deve ser constantemente vigiada, pois como foi demonstrado nos testes de suscetibilidade, os moluscos da espécie *B. tenagophila* estão se tornando cada vez mais suscetíveis.

ABSTRACT

Schistosomiasis is one of the most prevalent parasitic diseases worldwide. In Brazil, the spreading of *Schistosoma mansoni* intermediate host snails, such as that observed in the state Rio Grande do Sul (RS), may account for the dispersion of the disease. Aimed at reviewing the distribution of these snails in the municipality of Ravena, in the state of Minas Gerais, several areas investigated by 1980 were revisited. At that time, schistosomiasis prevalence was 36.7% and the intermediate hosts found were *Biomphalaria tenagophila* and *B. glabrata*. Among *B. glabrata* specimens, 1.5% was infected with *S. mansoni*, and no *B. tenagophila* samples eliminated cercariae. In the present investigation, snail collections were monthly carried out between January and June 2005 in ten different sites of Ravena. *Biomphalaria* has shown to be present in seven of the sites under study. A total of 3451 mollusks were collected, examined by means of artificial light exposure, and identified through morphological characters and PCR-RFLP and 357 were *B. glabrata* and 3094 *B. tenagophila*. None of them were infected with the parasite. Susceptibility tests were performed with three *B. tenagophila* populations from Ravena by using the *S. mansoni* SJ strain. The infection rates obtained were 3.8%, 4.0% and 5.0%, which was higher than those reported in previous studies for *B. tenagophila* in the same locality. In order to evaluate the genetic variability of those three populations, RAPD was employed by using the following three primers: 3302, 3304 and 3307. RAPD profiles were compared with other two *B. tenagophila* populations: one population from Taim/RS, regarded as resistant to *S. mansoni* and the other from Anchieta/ES, which has shown to be refractory to the parasite up to the present moment. Low genetic interpopulational variability and high intrapopulational variability were verified in the six populations analyzed. Data obtained in the present investigation shows that *S. mansoni* intermediate hosts remain in the municipality of Ravena, predominantly *B. tenagophila*, instead of *B. glabrata*. Although the snails collected were negative for *S. mansoni*, one may not state that the area is free of this parasitic disease as a greater number of mollusks need to be collected and further susceptibility analysis should be undertaken for a prevalence survey in the municipality.

1.1 - A esquistossomose

A esquistossomose é uma das parasitoses mais prevalentes no mundo, sendo endêmica em 76 países e territórios (Engels et al. 2002). Esta é uma doença intimamente associada à pobreza e ao baixo nível de desenvolvimento econômico, levando as populações a utilizarem águas contaminadas para a agricultura, trabalho doméstico e lazer (Katz & Peixoto 2000).

Estima-se que cerca de 200 milhões de pessoas encontram-se infectadas, enquanto outras centenas de milhões vivem em áreas endêmicas, expostas à infecção. Esta parasitose constitui um sério problema de saúde pública, colocando em risco em torno de 500 a 600 milhões de pessoas. Além disso, cerca de 20.000 pessoas morrem anualmente em consequência de doenças associadas, como o câncer de bexiga (esquistossomose urinária) e a fibrose (esquistossomose hepato-esplênica) (WHO 1993).

A doença é causada por um trematódeo do gênero *Schistosoma* e, entre as espécies conhecidas que infectam o homem podemos citar: *S. haematobium* Bilharz 1852, *S. japonicum* Katsurada 1904, *S. mansoni* Sambon 1907, *S. mattheei* Veglia & Le Roux 1929, *S. intercalatum* Fisher 1934, *S. mekongi* Vogé, Bruckner & Bruce 1978 e o *S. malayensis* Greer, Ow-Yang & Yong 1988.

No Brasil o agente etiológico da esquistossomose é o *S. mansoni* descrito pela primeira vez por Pirajá da Silva, na Bahia, em 1908. A esquistossomose mansônica apresenta formas agudas e/ou crônicas, com sintomatologia geral ou intestinal. Por vezes, podem surgir formas graves, com extensa fibrose hepática, hipertensão porta, esplenomegalia além da neuroesquistossomose. Sua introdução no continente americano ocorreu, provavelmente, no século XVI, com a chegada de escravos, originários das mais diversas regiões da África, que vieram trabalhar no cultivo da cana-de-açúcar (Magalhães 1970, Camargo 1980).

O grande número de pessoas infectadas e os constantes deslocamentos da população em busca de melhores condições de vida fazem com que os portadores humanos da esquistossomose sejam encontrados em todo o território nacional (Teles 2005). É importante ressaltar ainda que, indivíduos eliminando ovos do parasito e a ocorrência de planorbídeos suscetíveis à infecção, são dois fatores essenciais relacionados à expansão da doença no Brasil (Ruiz, 1957). Junte-se a esses dois fatores a ausência de saneamento básico e água tratada para grande parte da nossa população.

A ampla distribuição espacial aliada à facilidade de expansão da helmintose no território brasileiro confere à esquistossomose mansônica grande relevância no panorama da saúde pública (Passos & Amaral 1998). Apesar dessa importância, o único inquérito parasitológico nacional, mais abrangente e informativo, refere-se ao ano de 1950, realizado por Pellon e Teixeira. Este inquérito, direcionado para escolares na faixa etária de 7 a 14 anos de idade de 11 estados brasileiros, revelou uma prevalência de 10% e os autores estimaram em 2 milhões o número total de casos (Pellon & Teixeira 1950). Katz & Peixoto (2000), analisando os dados divulgados pela Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) e publicados por Passos e Amaral (1998), ressaltam que o número de portadores de 7,1 milhões em 1996 e 6,3 milhões em 1997 pode não representar a realidade, uma vez que a prevalência utilizada para esses cálculos não foi obtida através de amostra representativa da população nos diferentes estados brasileiros. Estes autores destacam ainda a necessidade de realização de um novo inquérito nacional de prevalência, onde as amostras sejam representativas das populações dos estados brasileiros.

Em 2004, Coura & Amaral realizaram um estudo comparativo dos dados disponíveis do Programa de Controle da Esquistossomose, Ministério da Saúde, no intuito de verificar a prevalência da doença em dois diferentes períodos, demonstrando assim a situação epidemiológica por estado (Tabela 1).

Tabela 01: Prevalência da esquistossomose no Brasil, por Estado, considerando o Programa de Controle nos períodos de 1980-1989 e 1990-2002 (Coura & Amaral, 2004).

States	Average of faeces exams/year	Percentage of positivity		
		Average	1980-1989	1990-2002
Alagoas	98.315	19,2	16,7	19,8
Goiás	2.777	3,1		(1995 - 2002)
Sergipe	51.229	17,3	16,3	17,7
Pernambuco	111.993	14,7	14,7	14,6
Distrito Federal	8.885	1,70	0,9	20,8
Bahia	512.218	10,2	10,9	9,7
Espírito Santo	94.248	11,1	14,0	8,4
Paraíba	135.199	9,7	10,4	9,1
Minas Gerais	294.730	10,1	10,4	10,1
Rio Grande do Norte	87.508	5,1	4,8	5,3
Maranhão	145.616	5,1	5,8	4,5
Rondônia	15.681	2,1		(1994 - 2002)
Paraná	58.454	2,4	2,4	2,4
Ceará	170.302	1,9	1,8	1,9
Rio de Janeiro	36.615	1,4	1,5	1,4
Santa Catarina	7.999	0,3	0,3	0,4
Pará	87.420	1,1	1,2	1,0
Piauí	22.020	0,3	0,4	0,04
Average for the country	1.929,733/year	11,5	12,5	9,2

Segundo Coura & Amaral (2004), o controle da doença no Brasil é dificultado por algumas razões: a) disseminação dos hospedeiros intermediários e seus mecanismos de escape de moluscidas; b) altos custos associados com a implementação de condições sanitárias e suprimento de água e também o intenso contato com água de populações rurais; c) o longo tempo necessário para educação sanitária e para a adesão das comunidades aos programas de controle; d) ineficiência do tratamento na redução da prevalência devido a re-infecções; e) a improvável proteção individual; f) ausência de uma vacina efetiva para a prevenção da doença.

1.2 - O ciclo de vida do *S. mansoni*

O *S. mansoni* possui um ciclo de vida complexo envolvendo reprodução sexuada e assexuada. Durante o ciclo, a fase assexuada ocorre no hospedeiro intermediário invertebrado e a fase sexuada no hospedeiro definitivo vertebrado. Os ovos são eliminados com as fezes do hospedeiro definitivo e ao entrarem em contato com a água, eclodem liberando miracídios que nadam e penetram na região cefalopodal dos moluscos. Transformam-se em esporocistos primários e secundários, nos quais as células germinativas multiplicam-se dando origem às cercárias de cauda bifurcada, após 25 a 35 dias. As cercárias eliminadas pelo molusco nadam ativamente até encontrar um hospedeiro definitivo, penetrando através da pele, ocasião em que perdem a cauda e formam os esquistossômulos que migram em direção aos vasos sanguíneos dirigindo-se ao coração, pulmão, fígado (onde alcançam a maturidade) e veias mesentéricas (28-48 dias após a penetração). Após o acasalamento, as fêmeas põem ovos de um a um, podendo chegar a até 300 por dia. Parte dos ovos cai na luz intestinal e são eliminados com as fezes, completando o ciclo. Outra parte dos ovos fica retida nos tecidos do fígado e paredes do intestino, dando origem a granulomas; outra é distribuída para diferentes órgãos através da corrente sanguínea podendo também originar granulomas. Os vermes adultos podem viver de 20 a 25 anos no organismo humano não tratado. Além do homem, são observados como hospedeiros definitivos, roedores, carnívoros, primatas não-humanos, marsupiais e bovinos (Souza & Lima, 1997) (Figura 1).

Ciclo de vida do *S. mansoni*

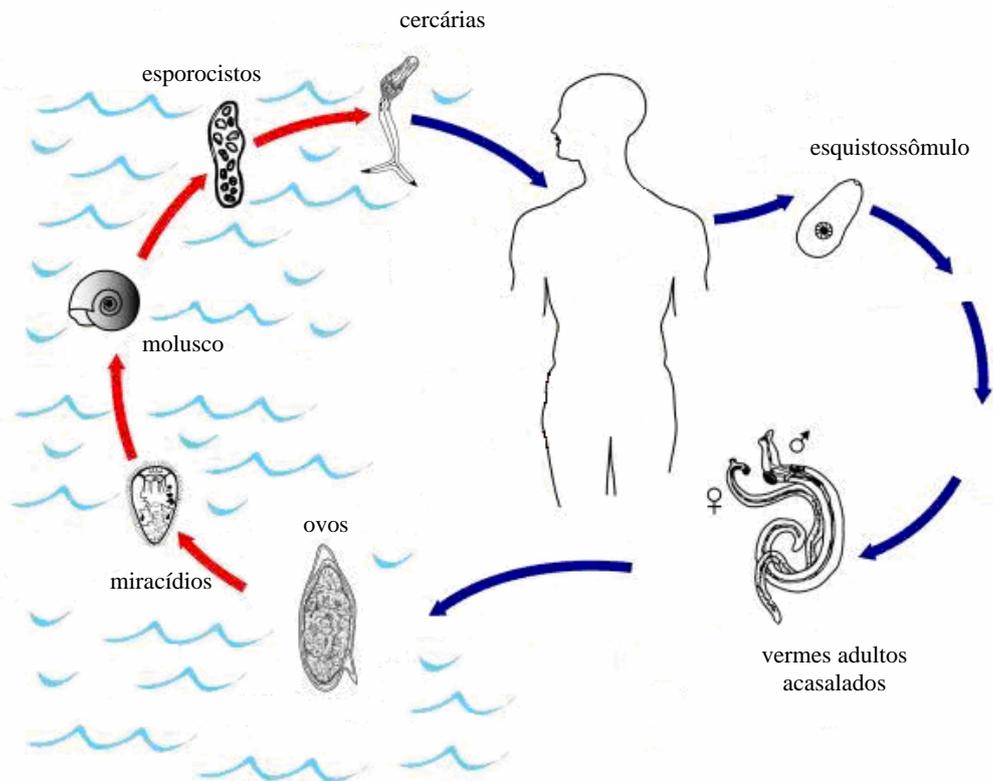


Figura 1: Desenho esquemático do ciclo de vida do *S. mansoni*

(<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/pt/3/3d/Esquistossomose.jpeg>, com modificações).

1.3 – Áreas endêmicas

No Brasil, a esquistossomose encontra-se distribuída do nordeste até a região sul, principalmente nos estados de Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia, Espírito Santo e Minas Gerais. Existem também outros focos da doença disseminados pelo país (Figura 2). Um dos focos mais recentes foi reportado no Rio Grande do Sul por Graeff-Teixeira et al. (1999).

Em Minas Gerais, a distribuição da esquistossomose mansoni não é regular, intercalando-se áreas de alta prevalência com áreas onde a transmissão é baixa ou nula. De fato, a doença é endêmica nas mesoregiões do Vale do Mucuri, Vale do Rio Doce, Zona da Mata, Norte, Jequitinhonha, Campo das Vertentes, Central Mineira, Metropolitana de Belo Horizonte e Oeste de Minas. As maiores prevalências são encontradas nas quatro primeiras mesoregiões citadas (Pellon & Teixeira 1950; Katz et al. 1978, Lambertucci et al. 1987). As mesoregiões do Noroeste, Sul/Sudoeste, Triângulo Mineiro e do Alto Paranaíba (à exceção dos municípios de Paracatu e Araxá, onde se encontram alguns focos da doença), localizadas na região ocidental do Estado eram consideradas, até recentemente, livres da endemia.

Em 1983, com a implantação pela Secretaria de Saúde do Programa de Controle da Esquistossomose no Estado de Minas Gerais (Katz 1986), a doença foi incorporada ao sistema de notificação compulsória, proporcionando o relato de um maior número de casos da parasitose, em áreas de baixa endemicidade, bem como de regiões onde nunca havia sido verificada sua ocorrência.

O desenvolvimento de determinadas áreas, com o surgimento de mão de obra migrante, determinaram a instalação de novos focos da esquistossomose em três regiões do Estado de Minas Gerais. O primeiro foi descrito na cidade de Itajubá, na região Sul do Estado como consequência da instalação do distrito industrial do município (Katz & Carvalho 1983).

Posteriormente, outro foco foi descrito na cidade de Paracatu, na região Noroeste do Estado, onde oito crianças com idade variando de 12 a 14 anos eliminavam ovos de *S. mansoni* nas fezes. O planorbídeo observado na área foi a *B. straminea*. Entretanto, dos 11.471 exemplares capturados, nenhum se encontrava positivo para *S. mansoni*. Nesta localidade foi verificada uma intensa atividade de extração de ouro de aluvião (Carvalho et al. 1988a), que atraiu migrantes de várias partes do país, que ali vivem em precárias condições sanitárias.

No Sudoeste do Estado, próximo à represa de Furnas no município de Passos, foi relatada a presença de *B. glabrata*, infectada por *S. mansoni*, em um clube campestre, nas imediações da cidade. Neste município observou-se um grande número de migrantes por

ocasião da colheita do café, produto de cultura relativamente recente no município (Carvalho et al 1988b) que atraía migrantes de várias partes do Estado, inclusive de regiões endêmicas para esquistossomose.

Constata-se desta forma, que a esquistossomose mansoni é uma doença em expansão no Estado de Minas Gerais, em que pese os conhecimentos adquiridos nos últimos anos, relacionados, sobretudo ao seu diagnóstico e tratamento.

Por outro lado, verifica-se que a carta planorbídica brasileira vem sendo construída de forma lenta, mas progressivamente acrescida de novas localidades com a presença de hospedeiros intermediários de *S. mansoni*. A dificuldade para adição de novos dados à distribuição dos planorbídeos brasileiros se prende, basicamente, a grande extensão territorial do País e a dificuldade de acesso a determinadas regiões.

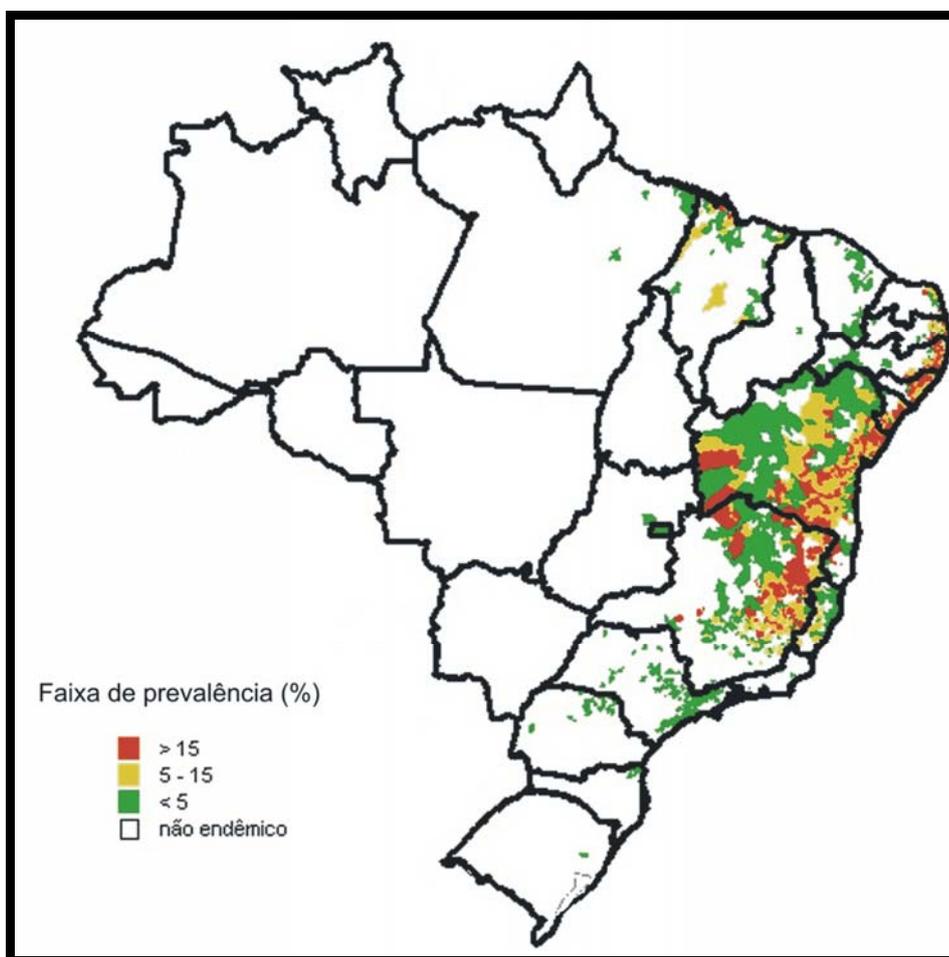


Figura 2: Distribuição da esquistossomose no Brasil (Fonte: Gerência Técnica de Esquistossomose / Secretaria de Vigilância em Saúde, 2002).

1.3.1 - Ravena, Sabará/MG

Em 1980, Coura-Filho et al. (1995) realizaram um trabalho sobre os determinantes ambientais da esquistossomose mansoni no distrito de Ravena, município de Sabará-MG. A prevalência da doença na população foi de 36,7%, sendo que as crianças até 14 anos apresentaram as maiores médias de ovos por grama de fezes. Os determinantes de risco identificados para a transmissão da doença estavam relacionados aos hábitos de nadar e pescar em córregos e clubes recreativos localizados nos arredores do distrito. Neste mesmo ano, após a instalação do serviço de água tratada pela COPASA em 90% das residências do distrito, Coura-Filho et al. (1996) realizaram tratamentos quadrienais (em 1980, 1984, 1988 e 1992) na população parasitada. Foi observada no decorrer do estudo, uma redução da prevalência para 11,5%, da carga de ovos e também da morbidade, entretanto estes autores ressaltam que não foi possível identificar qual das duas medidas (suprimento de água potável intradomiciliar ou tratamento específico) foi a responsável por essa redução.

Foi também realizado no estudo de Coura-Filho et al (1995), um levantamento malacológico em 15 coleções hídricas da região, nos quais foram coletados 8.989 planorbídeos, sendo 3.812 exemplares de *B. glabrata* em 12 delas, e 5.177 de *B. tenagophila* em um único curso de água. Entre as *B. glabrata* capturadas, 58 (1,5%) estavam parasitadas por *S. mansoni*, mas não foram encontrados exemplares de *B. tenagophila* eliminando cercárias desse parasito.

Estudos de suscetibilidade de *B. tenagophila* provenientes dessa localidade foram realizados utilizando três cepas de *S. mansoni*, com diferentes resultados. Carvalho & Souza (1980) registraram uma taxa de infecção de 5% com a cepa LE, utilizando 200 miracídios por molusco. Souza et al. (1983), não conseguiram infecção com três diferentes cepas (SJ, proveniente de São José dos Campos; LE, de Belo Horizonte; e SS, de Ravena), utilizando de 50 a 100 miracídios por molusco.

Ao analisar os aspectos determinantes para a transmissão da esquistossomose em sete áreas endêmicas no Brasil, Coura-Filho (1994) observou uma contínua utilização das coleções hídricas contaminadas, mesmo após a introdução do suprimento de água encanada, para atividades de lazer em áreas urbanas e de atividades profissionais (agricultura e doméstica) em áreas rurais.

Outra observação relevante oriunda de áreas onde foram desenvolvidos programas de controle foi a eliminação de ovos do parasito por um número pequeno de pacientes não

diagnosticados, não curados, re-infectados ou não tratados (Coura-Filho et al. 1996) que poderiam estar mantendo o ciclo da doença.

Desde 1996, nenhum outro trabalho, relacionado à esquistossomose, foi realizado em Ravena, sendo desconhecida a situação atual da doença no distrito. Após 25 anos da implantação de medidas de controle, é possível que hoje, com a presença de portadores associados aos hábitos de risco da população e a presença de moluscos infectados, ainda haja transmissão da doença na localidade.

Esta dissertação é parte de um projeto que pretende re-avaliar a situação da esquistossomose no distrito de Ravena. Tal projeto inclui estudos malacológicos e epidemiológicos, bem como exames parasitológicos, tratamento da população e implantação de um trabalho de educação em saúde nas escolas da região. Portanto, o presente trabalho apresentará os primeiros resultados deste estudo com um enfoque voltado para os hospedeiros intermediários do *S. mansoni* presentes na região.

1.4 - Hospedeiros intermediários

1.4.1 - Considerações gerais

Os hospedeiros intermediários do *S. mansoni* na América do Sul (Figura 3), América Central e na África são moluscos de água doce pertencentes ao gênero *Biomphalaria* Preston, 1910 (Filo Mollusca: Classe Gastropoda: Subclasse Pulmonata: Ordem Basommatophora: Família Planorbidae).

No Brasil, são conhecidas dez espécies e uma subespécie de moluscos desse gênero: *B. glabrata* (Say, 1818), *B. tenagophila* (Orbigny, 1835), *B. straminea* (Dunker, 1948), *B. peregrina* (Orbigny, 1835), *B. schrammi* (Crossi, 1864), *B. kuhniana* (Clessin, 1883), *B. intermedia* Paraense & Deslandes, 1962, *B. amazonica* Paraense 1966, *B. oligoza* Paraense 1974, *B. occidentalis* Paraense 1981 e *B. t. guaibensis* Paraense 1984. Entre essas espécies somente as três primeiras já foram encontradas naturalmente infectadas pelo *S. mansoni*. Outras duas espécies, *B. peregrina* e *B. amazonica*, foram infectadas experimentalmente e são consideradas hospedeiras em potencial desse parasito (Corrêa & Paraense 1971, Paraense & Corrêa 1973).



Figura 3 – Distribuição geográfica das espécies hospedeiras intermediárias do *Schistosoma mansoni* na América do Sul (Paraense 2001).

1.4.2 - Biologia

Para uma melhor compreensão da capacidade adaptativa dos planorbídeos do gênero *Biomphalaria*, é necessário conhecer alguns possíveis fatores que contribuem para a dinâmica das populações desses moluscos. De uma maneira geral são encontrados em pequenas coleções hídricas com velocidade inferior a 30cm/segundo, com vegetação vertical ou flutuante. Entretanto, alguns exemplares podem migrar contra a correnteza ocupando lentamente criadouros a montante das colônias originais. São capazes de sobreviver em uma grande variedade de coleções de água doce, paradas ou com pouca correnteza (lagos, lagoas, poços, córregos, rios, riachos, etc.) e quaisquer outras coleções hídricas natural ou artificialmente alagadas. Alimentam-se de vegetais aquáticos, restos de animais e vegetais em decomposição, algas, bactérias e microorganismos presentes no limo que se formam nas superfícies encobertas pela água (Paraense 1972).

Um mecanismo adaptativo importante desses moluscos é a estratégia reprodutiva, que desempenha papel fundamental na perpetuação das espécies. De fato, por serem hermafroditas, em condições favoráveis optam pela fecundação cruzada e aumentando a variabilidade; já em condições desfavoráveis, um ou poucos indivíduos podem utilizar o mecanismo de autofecundação, dando início a uma nova população (efeito fundador). A possibilidade da formação de uma nova população, a partir de um único indivíduo, permite explicar a ocorrência de certas colônias de planorbídeos com características peculiares e pequena variação individual (Paraense 1955).

Esses moluscos desenvolveram inúmeros mecanismos de sobrevivência e escape, como a brusca parada no desenvolvimento, controlada por fatores internos, mesmo quando as condições do meio são favoráveis (diapausa) ou a quiescência, determinada diretamente por condições desfavoráveis do meio, manifestando-se na forma de parada do desenvolvimento, induzida pela elevação da temperatura (estivação), ou pelo abaixamento da temperatura a um nível tal que faz cessar todo desenvolvimento (hibernação).

São capazes de enterrarem-se no solo dos ambientes aquáticos (hidropsamon) e fora deles (eupsamon), devido à formação de ambientes aquáticos temporários, como poças d'água formadas por chuvas ou inundações, que vão ressecando lentamente. Esse comportamento parece estar relacionado a hábitos de nutrição ou de proteção, ou mesmo de ambos. O enterramento pode coincidir também com a aplicação de moluscicida.

Estes planorbídeos possuem uma grande capacidade de adaptação a diferentes condições ambientais, podendo tolerar grandes variações nas características físicas, químicas e biológicas do local onde vivem (Paraense 1972). Além disso, possuem resistência à dessecação, caso esta ocorra de forma lenta, mas progressiva (como é comum ocorrer em algumas áreas do Nordeste brasileiro), podendo resistir vivos por um longo período e até mesmo formar novas populações (Barbosa & Olivier 1958). Mesmo em regiões onde as populações desses planorbídeos sejam quase extintas, a recolonização pode ocorrer a partir do efeito fundador. É importante ressaltar ainda que um único espécime sobrevivente tem a capacidade de produzir cerca de 10 milhões de descendentes ao final de 90 dias de postura (Paraense 1955)

1.4.3 - Suscetibilidade

A suscetibilidade dos moluscos do gênero *Biomphalaria* ao *S. mansoni* pode variar entre áreas geográficas (Paraense & Corrêa 1963, 1978; Malek & Rouquayrol 1986), populações na mesma área, indivíduos dentro da mesma população e também entre moluscos de diferentes idades (Richards 1970, 1984, Richards & Shade 1987). Estudos demonstraram que a infecção

de *B. glabrata* pelo *S. mansoni* depende de uma interação complexa, determinada pelos genes do parasito e do molusco. Em exemplares jovens acredita-se que a resistência seja baseada em interações complexas de outros fatores genéticos ainda não conhecidos (Richards & Shade 1987). Uma melhor compreensão sobre os genes do parasito e dos hospedeiros pode levar ao estabelecimento de novos métodos de controle da doença.

Richards (1970) demonstrou que a suscetibilidade de *B. glabrata* jovens foi determinada por um complexo de fatores genéticos e que um simples fator dominante pode levar moluscos jovens suscetíveis a se tornarem resistentes à infecção na fase adulta. Segundo Lewis et al. (1993), as interações parasito hospedeiro são influenciadas por genes do molusco que controlam a suscetibilidade e genes do parasito que determinam a infectividade.

1.4.4 - *Biomphalaria tenagophila*

Na América Latina, *B. tenagophila* está presente na Argentina, Peru, Bolívia, Paraguai e Uruguai (Paraense 2001) (Figura 2). No Brasil, esta espécie distribui-se continuamente por larga faixa costeira que se estende do Sul da Bahia até o Chuí, Rio Grande do Sul (Paraense 1986). Paraense & Corrêa (1989) chamam a atenção para o importante papel da *B. tenagophila* como vetor do *S. mansoni* nas regiões sul e sudeste, nas quais a esquistossomose vem se expandindo nos últimos anos de forma lenta, mas constante.

Em relação à *B. tenagophila* verifica-se uma maior compatibilidade com cepa SJ (São José dos Campos, SP) do que com as demais cepas de *S. mansoni* até o momento estudadas (Carvalho et al. 1979, Corrêa et al. 1979, Paraense & Corrêa 1963, Santos et al. 1979, Souza et al. 1983, 1987, 1995). Entretanto, já foi descrita uma linhagem de *B. tenagophila* proveniente da Reserva Ecológica do Taim (Rio Grande do Sul, Brasil) resistente ao *S. mansoni* (Coelho 1995). Esta linhagem sempre se mostrou resistente à infecção, mesmo quando desafiada com diferentes cepas e quantidades de miracídios desse parasito (Coelho et al. 2004). Nem mesmo altas doses de radiação gama foram suficientes para que estes moluscos se tornassem suscetíveis ao *S. mansoni* (Martins-Souza et al. 2003). Rosa et al. (2005) realizaram estudos utilizando a técnica de RAPD em busca de marcadores genéticos associados à resistência nos descendentes F2 resistentes e suscetíveis resultantes do cruzamento entre *B. tenagophila* do Taim/RS (resistente) e *B. tenagophila* Joinvile (susceptível). Entretanto não foi possível detectá-los. Barbosa et al. (2006) demonstraram que o transplante do órgão hematopoético (APO) de exemplares da população do Taim para espécimes suscetíveis, originários de Cabo Frio foi capaz de conferir resistência a última. Rosa et al. (2004) demonstraram que o

cruzamento de espécimes da população do Taim com espécimes suscetíveis geraram descendentes resistentes ao *S. mansoni*. Esses cruzamentos obedeciam às leis de Mendel cuja proporção é de três partes resistentes para uma suscetível. Em virtude disso, Coelho et al. (2004) sugeriram a introdução dessa linhagem resistente como controle biológico em áreas onde a transmissão da esquistossomose é feita por *B. tenagophila*.

Outra população de *B. tenagophila* que tem se mostrado resistente a diferentes cepas de *S. mansoni* é proveniente de Anchieta/ES. Esta população foi recebida recentemente no Moluscário Lobato Paraense do CPqRR/Fiocruz onde estão sendo realizados alguns estudos. Testes de suscetibilidade foram feitos, onde a geração F1 desses moluscos foi desafiada com 50 miracídeos das cepas LE e SJ de *S. mansoni* e todos se apresentaram resistentes à infecção. Devido a estes resultados, a população de Anchieta/ES foi considerada resistente neste estudo, entretanto novos experimentos ainda serão realizados para que isto seja confirmado.

1.4.5 - Identificação morfológica

A correta identificação dos planorbídeos do gênero *Biomphalaria* permite conhecer a fauna de moluscos de uma determinada região e a detectar espécies presentes em áreas de transmissão da esquistossomose, bem como em áreas indenes, mas que em função da presença de espécies suscetíveis podem vir a se tornar focos da parasitose.

A identificação morfológica destes planorbídeos baseia-se na comparação dos caracteres da concha, aparelho reprodutor masculino e feminino, e do sistema excretor, conforme estabelecido por Deslandes (1951) e Paraense (1975, 1981, 1984, 1988) (Figuras 4, 5, 6 e 7). Entretanto, a identificação pode ser dificultada pela grande variação observada nesses caracteres devido ao seu estado de distensão no momento da fixação (Paraense 1975) ou também a variações morfológicas intraespecíficas (Paraense 1966). Devido a essas variações, são relevantes, no diagnóstico desses moluscos, a habilidade e a especialização do investigador em dissecar e caracterizar as espécies em função das diferenças morfológicas.

Em decorrência da diversidade morfológica e biológica observada no gênero *Biomphalaria*, técnicas moleculares têm sido associadas com os caracteres morfológicos, no intuito de auxiliar na identificação destes moluscos.

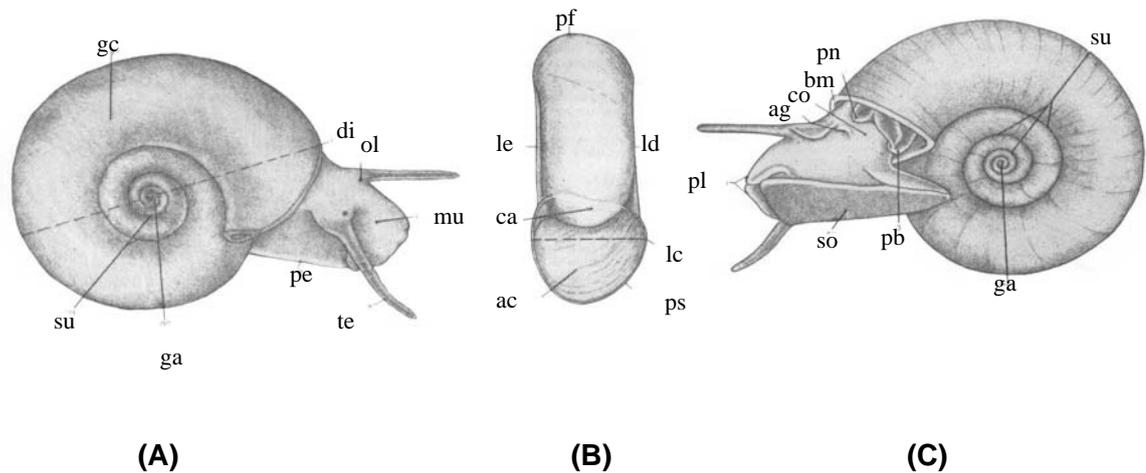


Figura 4 - Concha de *Biomphalaria* vista pela direita (A), de frente (B) e pela esquerda (C).
 Legenda: **ac**: abertura da concha, **ag**: abertura genital masculina, **bm**: borda do manto, **ca**: calo, **co**: colo, **di**: diâmetro da concha, **ga**: giro apical ou interno (primeiro giro), **gc**: giro corporal ou externo (último giro), **lc**: largura da concha (diâmetro horizontal da abertura), **ld**: lado direito, **le**: lado esquerdo, **mu**: mufla, **ol**: olho, **pb**: pseudobrânquia, **pe**: pé, **pf**: periferia, **pl**: palpos labiais, **pn**: pneumóstoma, **ps**: perístoma, **so**: sola, **su**: sutura, **te**: tentáculo (Paraense, 1972).

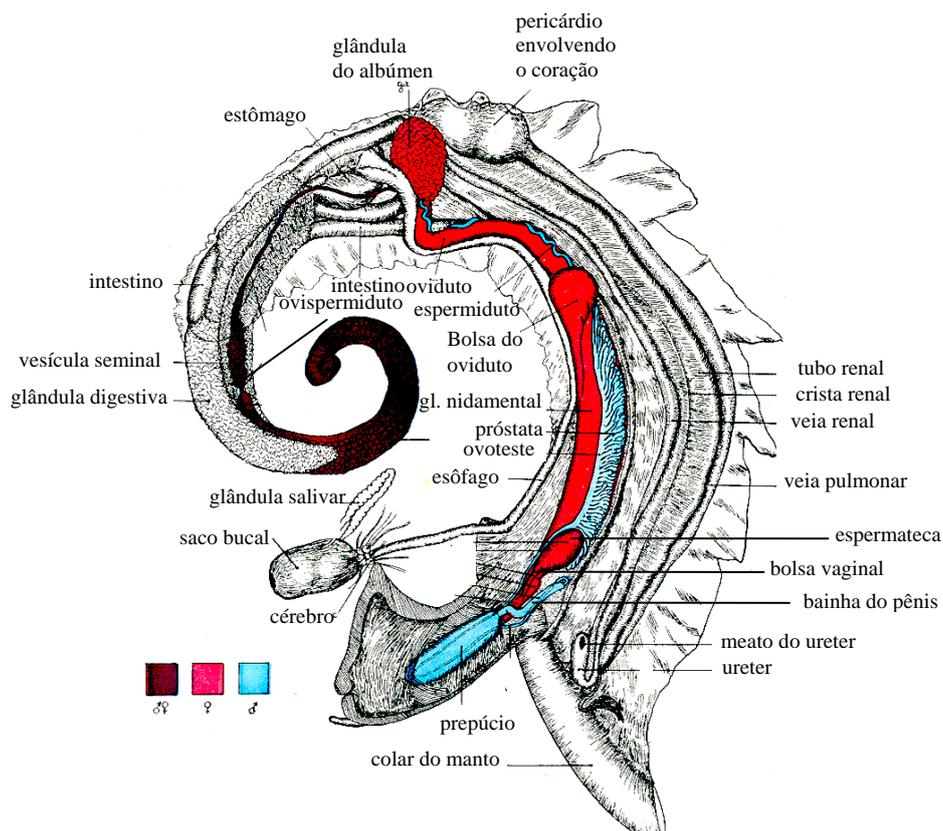


Figura 5: Vista lateral dos órgãos de *Biomphalaria glabrata* com o manto e o saco bucal dissecados, em destaque o aparelho reprodutor masculino e feminino (Paraense & Deslandes 1955).

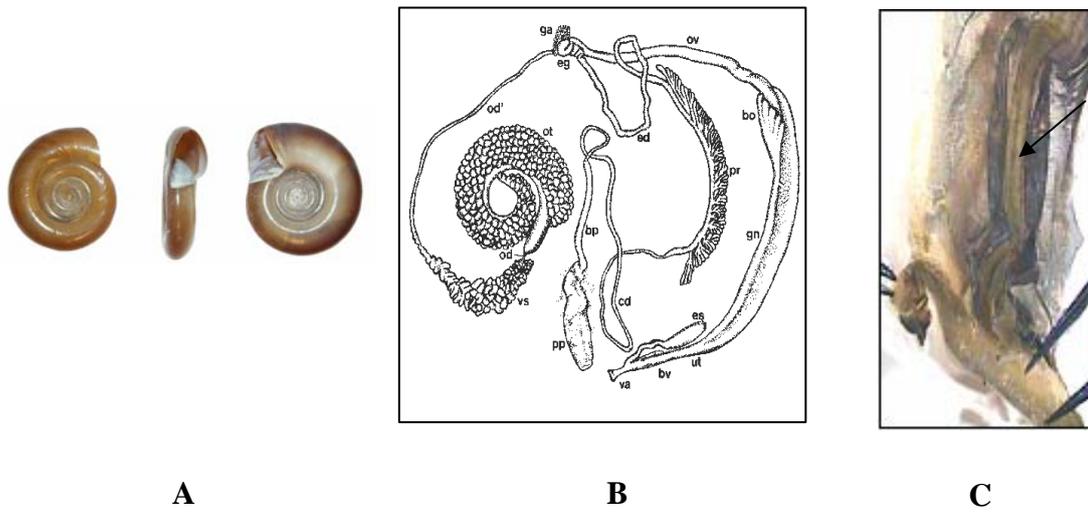


Figura 6: Caracteres morfológicos utilizados para a identificação de *B. glabrata*. (A) Concha, (B) Aparelho reprodutor masculino e feminino, (C) Manto.

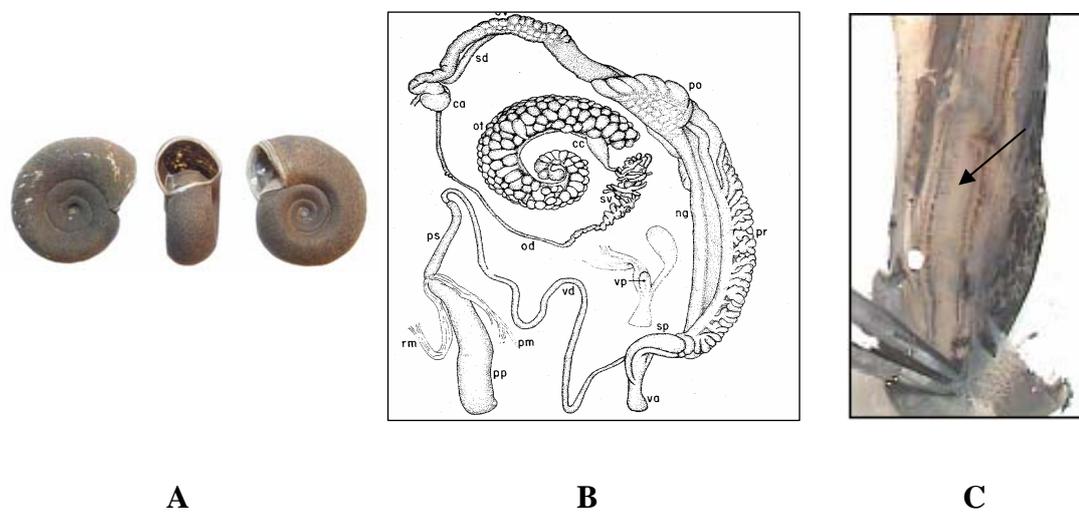


Figura 7: Caracteres morfológicos utilizados para a identificação de *B. tenagophila*. (A) Concha, (B) Aparelho reprodutor masculino e feminino, (C) Manto.

1.5 - Técnicas moleculares

1.5.1 - Identificação molecular

A reação em cadeia da polimerase (PCR) descrita por Saiki et al. (1985) causou uma grande revolução na Biologia. Esta técnica consiste na síntese enzimática *in vitro* de seqüências específicas de DNA através de uma série de ciclos a diferentes temperaturas (desnaturação das fitas de DNA, anelamento dos iniciadores e extensão da região flanqueada pelo iniciador). Este processo permite o acúmulo exponencial dos fragmentos delimitados pelos iniciadores gerando ao final da reação a produção de milhões destes fragmentos.

A PCR-RFLP (reação em cadeia da polimerase e polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição), se baseia na amplificação pela PCR de qualquer região do DNA e a subsequente digestão do fragmento amplificado com enzimas de restrição que cortam a fita dupla em sítios específicos de reconhecimento (sítios de restrição). Esta técnica foi descrita no mesmo trabalho de Saiki et al. (1985) e tem sido utilizada na identificação molecular de espécies de *Leishmania* (Rotureau et al. 2006), análise genética de *Toxoplasma gondii* (Ferreira et al. 2006), separação de espécies de nematóides (Otranto et al. 2001, Caldeira et al. 2003) e identificação de moluscos do gênero *Bulinus* (Raahauge & Kristensen 2000).

Em moluscos do gênero *Biomphalaria* a PCR-RFLP vem sendo amplamente utilizada (Vidigal et al. 2000, 2004, Carvalho et al. 2001, Rosa et al. 2004, Caldeira et al. 2000, Velasquez et al. 2002). Esses autores amplificaram a região espaçadora transcrita interna (ITS) do gene do rRNA (Figura 8), constituído por três regiões conservadas 18S, 5.8 e 28S e duas regiões espaçadoras (ITS1 e ITS2). Os iniciadores anelam-se na porção final da região 18S e na inicial da 28S gerando um fragmento de aproximadamente 1.300 pares de base. Após a amplificação o fragmento é submetido à digestão com enzimas de restrição, gerando perfis espécie-específicos.

Analisando dos perfis de restrição obtidos com *DdeI*, Vidigal et al. (2000) elaboraram um diagrama para as 10 espécies e uma subespécie do gênero *Biomphalaria* existentes no Brasil que é utilizado rotineiramente para identificação dos moluscos brasileiros deste gênero (Figura 9). Esta região do DNA também foi estudada por Barbosa et al. (2006) utilizando a PCR-RFLP, observando que a população de *B. tenagophila* do Taim possui como marcador um fragmento adicional de 350 pb, além dos fragmentos espécie específicos de 800 e 470 pb, descritos por Vidigal et al. (2000). Foi demonstrado ainda por Rosa et al. (2004), que é possível detectar este marcador em indivíduos da geração F1 e F2, provenientes do cruzamento desta linhagem com outra suscetível.

Em outro estudo, Caldeira et al. (2004) obtiveram sucesso na identificação de moluscos do gênero *Biomphalaria* a partir de DNA extraído de traços de matéria orgânica de conchas depositadas em coleções malacológicas por até 10 anos. Neste trabalho a PCR-RFLP foi direcionada para a região espaçadora ITS2, que é uma região menor, uma vez que o DNA alvo poderia estar degradado.

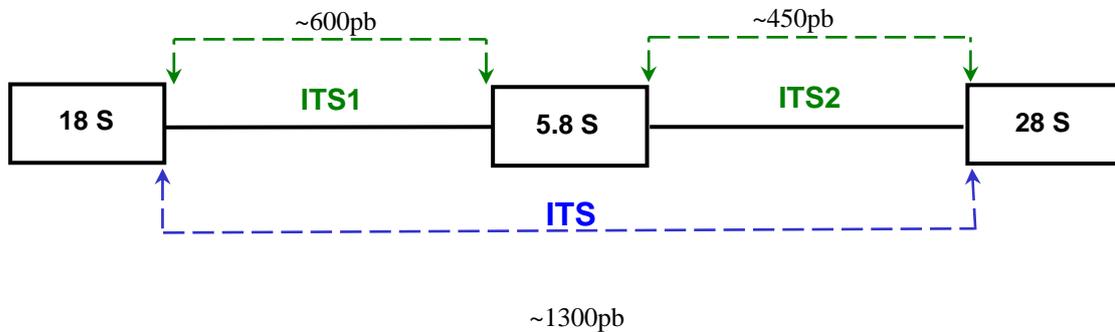


Figura 8: Desenho esquemático do gene do RNA ribossomal.

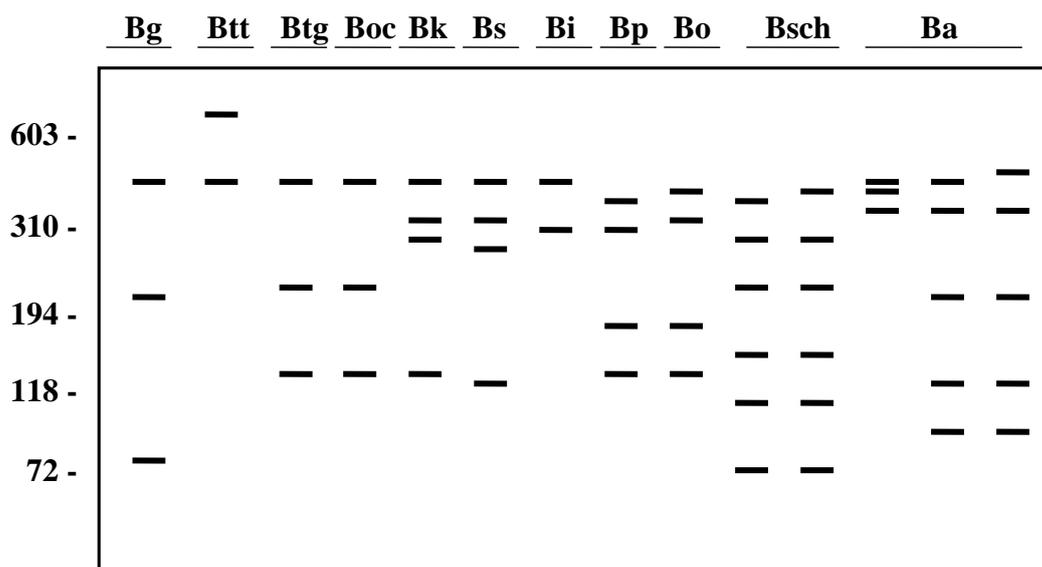


Figura 9: Diagrama representativo dos perfis espécie-específicos das dez espécies e uma sub-espécie brasileiras do gênero *Biomphalaria*. **Bg:** *Biomphalaria glabrata*, **Btt:** *B. tenagophila tenagophila*, **Btg:** *B.t. guaibensis*, **Boc:** *B. occidentalis*, **Bk:** *B. kuhniiana*, **Bs:** *B. straminea*, **Bi:** *B. intermedia*, **Bp:** *B. peregrina*, **Bo:** *B. oligoza*, **Bschr:** *B. schrammi*, **Ba:** *B. amazonica* (Vidigal et al. 2000).

1.5.2 - Variabilidade genética

Uma outra variante da PCR é a técnica de RAPD (polimorfismos de DNA amplificados aleatoriamente) que amplifica regiões do DNA sem a necessidade do conhecimento prévio das seqüências do organismo em estudo, portanto, não necessita de iniciadores específicos. Os produtos polimórficos são gerados pela amplificação de fragmentos do DNA através de pequenos iniciadores de seqüências aleatórias e sob condições de baixa estringência (Welsh & McClelland 1990, Williams et al.1990). O iniciador utilizado em cada reação produzirá fragmentos através do seu anelamento e distribuição ao acaso dentro do genoma. Os polimorfismos detectados pela RAPD podem ter origens em inserções ou deleções no sítio de ligação do iniciador, o que poderia alterar o tamanho final destes fragmentos ou até mesmo gerar novos locais de ligação dos iniciadores (Williams et al.1990).

Esta técnica tem sido utilizada em estudos relacionados a variabilidade genética de alguns organismos como: *Anopheles* (Calado & Navarro-Silva 2006), *Lutzomyia* (Margonari et al. 2004), nematóides (Lax et al. 2004, Cofcewicz et al. 2004), moluscos do gênero *Lymnaea* (Cardoso et al. 2006) e também em linhagens resistentes de *Pseudosuccinea columella* resistentes e suscetíveis a *Fasciola hepatica* (Gutiérrez et al. 2003, Calienes et al. 2004).

Em relação aos moluscos do gênero *Biomphalaria*, diversos estudos já foram realizados utilizando a técnica de RAPD (Carvalho et al. 2001, Pires et al. 1997, Vidigal et al. 1994). Esses autores estudaram a variabilidade genética de populações de *B. glabrata*, *B. tenagophila*, *B. occidentalis* de várias regiões do Brasil, e encontraram uma baixa variabilidade intrapopulacional e uma alta variabilidade interpopulacional. Spada et al. (2002), buscando marcadores ligados à resistência em *B. glabrata*, observaram bandas polimórficas somente na linhagem suscetível. Abdel-Hamid et al. (1999) estudando a variabilidade genética de *B. tenagophila*, encontraram diferenças intrapopulacionais entre moluscos suscetíveis e resistentes.

Simpson et al. (1995) analisando o genoma do *S. mansoni* e de *B. glabrata*, observaram um maior polimorfismo intraespecífico no molusco em relação ao parasito. Estes autores ressaltam ainda, o importante papel da genética do molusco hospedeiro e sugerem que esta pode ser mais importante que a do parasito na determinação da epidemiologia da esquistossomose.

2.1 - Geral

Estudar os hospedeiros intermediários do *S. mansoni* no distrito de Ravena, município de Sabará-MG.

2.2 - Específicos

- Realizar um levantamento malacológico de moluscos do gênero *Biomphalaria* nas diferentes coleções hídricas do perímetro urbano do distrito de Ravena pesquisadas na década de 80.
- Investigar a ocorrência de *Biomphalaria* infectada com *S. mansoni*
- Identificar as espécies de *Biomphalaria* através da morfologia e da técnica de PCR-RFLP direcionada para a região espaçadora transcrita interna (ITS) do gene do RNA ribossomal.
- Avaliar populações de *B. tenagophila* do distrito quanto à suscetibilidade a cepa SJ de *S. mansoni*, mantida em laboratório.
- Estudar a variabilidade genética intra e interpopulacional, das populações de *B. tenagophila* do distrito, através da técnica de RAPD.
- Comparar os polimorfismos de DNA amplificados aleatoriamente obtidos pela técnica de RAPD das populações suscetíveis de *B. tenagophila* encontradas no distrito de Ravena com os perfis da população resistente do Taim/RS e de outra oriunda de Anchieta/ES que até o momento tem se mostrado resistente.

3.1 - Área estudada

O distrito de Ravena, pertencente ao município de Sabará, está localizado cerca de 30 km de Belo Horizonte, às margens da BR-262. Três localidades compõem a área: Ravena, Ravenópolis e Lavapés.

3.2 - Coleta de moluscos

Foram realizadas coletas mensais durante seis meses (Janeiro a Junho de 2005). Dez coleções hídricas da região foram selecionadas: Rio Vermelho (Figura 10), Córrego Florêncio (Figura 11), Poço artesiano (Figura 12), Lagoa da Cotochés (Figura 13), Córrego Lavapés (Figura 14), Poço ao lado do córrego Lavapés, Vala 1 (Figura 15), Lagoa Nova (Figura 16), Corguinho (Figura 17) e Vala da Bomba (Figura 18). Para a coleta foi utilizada uma concha metálica perfurada que foi mergulhada na água 10 vezes a cada 10 passos nos mesmos trechos delimitados anteriormente por Coura-Filho et al. (1995). Os moluscos coletados foram armazenados em sacos plásticos, identificados por ponto de coleta e transportados ao laboratório para mensuração da concha, identificação específica e exame para verificar a presença de cercárias de *S. mansoni*.



Figura 10: Rio Vermelho.



Figura 11: Córrego Florêncio.



Figura 12: Poço artesiano.



Figura 13: Lagoa da Cotochés.



Figura 14: Córrego Lavapés.



Figura 15: Vala 1.



Figura 16: Lagoa Nova.



Figura 17: Corguinho.



Figura 18: Vala da Bomba.

3.3 - Exame dos moluscos

3.3.1 - Por exposição à luz artificial

Após mensuração, os moluscos foram colocados, individualmente, em recipientes de vidro contendo água desclorada e aquecida a 28°C, e expostos à luz artificial por 30 a 40 minutos. Decorrido esse período, os moluscos foram examinados com o auxílio de microscópio estereoscópico, para verificar a presença de cercárias. A taxa de infecção foi calculada utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Taxa de infecção} = \frac{100 \times \text{n}^\circ \text{ de moluscos positivos}}{\text{Total de moluscos examinados}}$$

3.3.2 - Por esmagamento

Os moluscos que estavam negativos pelo exame de exposição à luz foram esmagados entre placas de vidro e examinados em microscópio estereoscópico para verificar a presença de esporocistos e/ou cercárias.

3.4 - Identificação morfológica

Após o exame por exposição à luz artificial, uma amostra de cinco moluscos coletados em cada coleção hídrica foi separada para estudos morfológicos. Estes foram anestesiados, sacrificados e um fragmento da região cefalopodal foi retirado para extração de DNA e utilização nos estudos moleculares. O restante do corpo foi estocado no fixador de Haillet-Henry e a concha em frascos com algodão. A identificação morfológica foi realizada com base na comparação dos caracteres da concha, aparelho reprodutor masculino e feminino, e do sistema excretor, conforme estabelecido por Deslandes (1951) e Paraense (1975, 1981, 1984, 1988).

3.5 - Avaliação de suscetibilidade de *B. tenagophila*

3.5.1 - Obtenção de molusco F1

Exemplares coletados na Lagoa da Cotochés, Córrego Florêncio e Rio Vermelho foram criados e mantidos, separadamente, no Moluscário Lobato Paraense do CPqRR para obtenção da geração F1.

3.5.2 - Obtenção das cepas SJ de *S. mansoni*

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) da linhagem Swiss webster machos e fêmeas, com aproximadamente 40 dias de vida, criados no biotério do Centro de Pesquisas René Rachou, nos quais foram inoculadas cercárias de *S. mansoni* da cepa SJ. Estes camundongos foram sacrificados com éter, e seus fígados triturados em liquidificador junto com solução salina a 0,85%. Esta solução foi transferida para um cálice e mantida na ausência de luz por 30 minutos. Em seguida foram feitas lavagens sucessivas com água desclorada até a solução ficar limpa. Desprezou-se o sobrenadante e o sedimento contendo os ovos foi transferido para um balão volumétrico escuro com extremidade clara contendo água desclorada a 28°C, e exposto à luz artificial para eclosão dos miracídios (Pellegrino & Katz 1968, modificado por Jannotti-Passos 1998).

3.5.3 - Infecção dos moluscos

Foram utilizados 100 exemplares de *B. tenagophila* da geração F1 provenientes de cada uma das seguintes coleções hídricas: Lagoa da Cotochés, Córrego Florêncio e Rio Vermelho. Estes moluscos foram expostos, individualmente, a 50 miracídios de *S. mansoni* da cepa SJ proveniente de São José dos Campos e mantida no moluscário. Para este processo foram utilizadas placas de cultura de células, com tampa, com 24 divisões cilíndricas e com capacidade de 2,5 ml cada uma. Em cada divisão foi introduzido um molusco, medindo de 8 a 10 mm de diâmetro e adicionado 2,5 ml de água desclorada contendo 50 miracídios. Os moluscos permaneceram em contato com os miracídios durante 4 horas sob luz artificial. Posteriormente foram transferidos para aquários que continham sistema de água corrente, aeração constante e temperatura de 27±1°C. Concomitantemente a estes experimentos, *B. glabrata* provenientes da região do Barreiro (Belo Horizonte - MG) e mantidas em laboratório, foram infectadas utilizando 20 miracídios por molusco, para controle de viabilidade dos miracídios. Também foram separados grupos de 30 moluscos da geração F1, não infectados, de cada uma das diferentes localidades para controle de mortalidade. Exames

por exposição à luz artificial (de acordo com o procedimento citado no item 3.3.1) foram realizados após 30, 37 e 44 dias para verificar a presença de cercárias de *S. mansoni*. Após o terceiro exame, aqueles indivíduos que não eliminaram cercárias, foram esmagados entre placas de vidro (de acordo com o procedimento citado no item 3.3.2).

3.6 - Estudos moleculares

3.6.1 - Extração do DNA dos moluscos

A extração de DNA foi realizada utilizando o kit *Wizard Genomic DNA Purification* da Promega (Vidigal et al. 2000). Inicialmente o fragmento do pé foi colocado em 200µl de solução de lise nuclear e incubado por 12 a 16 horas com 50 mg/ml de proteinase K em banho-maria a 37°C. Em seguida foram adicionados 80µl de solução de precipitação protéica. Esse preparado foi submetido ao vortex e centrifugado a 13.000 rpm por 5 min. O sobrenadante contendo o DNA foi transferido para outro tubo contendo 200µl de isopropanol para precipitação do DNA que foi misturado por inversão por 20 min e centrifugado a 13.000 rpm por 5 min. O DNA foi lavado com 300µl de etanol a 70%. O pellet foi tratado com 25µl de solução de re-hidratação de DNA por 30 min a 37°C e estocado à -20°C.

3.6.2 - Identificação Molecular

Uma amostra de cinco moluscos coletados em cada ponto foi separada para realização da identificação molecular. Primeiro foi realizado o PCR específico e em seguida a digestão dos fragmentos com a enzima *DdeI* para a produção dos perfis de restrição.

3.6.2.1 - PCR específico

A amplificação da região ITS foi realizada utilizando-se os iniciadores ETTS1 (5'-TGCTTAAGTTCAGCGGGT-3') e ETTS2 (5'-TAACAAGGTTTCCGTAGGTGAA-3') (Kane e Rollinson 1994) homólogos às extremidades conservadas 18S e 28S. A PCR, com um volume total de 10 µl, consiste de 10-20 ng de DNA alvo, tampão (1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10mM Tris-HCl, pH 8,5), 200 µM de cada dNTP, 1,0 U de *Taq*-DNA polimerase (DNA polimerase termoestável da bactéria *Thermus aquaticus*) e 6,4 pmoles de cada iniciador. A reação foi coberta com uma gota de óleo mineral e submetida aos ciclos de amplificação onde a desnaturação inicial foi feita por 3 minutos a 95°C, seguida de 33 ciclos: anelamento a 54°C

por 1 minuto, extensão a 72°C por 2 minutos e desnaturação a 95°C por 45 segundos, e uma extensão final a 72°C por 5 minutos.

Todos os experimentos foram acrescidos de um controle negativo, sem adição de DNA. Três microlitros do produto de amplificação acrescentado de 3µl de tampão de amostra foram

submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 6% e corados pela prata para observação do perfil dos produtos de PCR.

3.6.2.2 - Produção dos perfis de restrição da região ITS

Do produto de PCR, foi separado uma alíquota de 10µl adicionando-se 0,3µl da enzima *DdeI* juntamente com 1,0µl de seu respectivo tampão, obtendo um volume final de 11,3µl. Este produto foi deixado por 3,5 horas a uma temperatura de 37°C. Em seguida foi adicionado 13µl de fenol-clorofórmio (1/1) e posteriormente centrifugado por 2 min. Após transferir o sobrenadante para outro tubo, 3µl do produto da digestão acrescentado de 3µl de tampão de amostra foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% corados por nitrato de prata. Os perfis obtidos foram comparados com os perfis já descritos por Vidigal et al. (2000) como característicos da espécie.

3.6.3 - Estudo de variabilidade genética

Em todos os moluscos utilizados nos estudos de variabilidade genética, foram realizados exames durante sete semanas consecutivas para verificação da presença de cercarias de trematódeos. Ao final dos exames, foram selecionados somente aqueles que não eliminaram nenhum tipo de cercaria. Também foram utilizados neste estudo exemplares resistentes a infecção pelo *S. mansoni* procedentes de Anchieta/ES e do Taim/RS mantidos no Moluscário do CPqRR. Na Tabela 2 encontram-se as localidades, número de exemplares e os respectivos códigos de todas as populações de *B. tenagophila* utilizadas neste estudo. Em todos os experimentos de variabilidade genética foi adicionado 1 exemplar de *B. t. guaiabensis* que funcionou como grupo externo de comparação.

Tabela 2: Localidades, número de exemplares e códigos das populações de *B.tenagophila* utilizadas no estudo de variabilidade genética.

Localidade	Nº de exemplares utilizados	Código dos exemplares
Taim (RS)	20	T01 a T20
Lagoa da Cotochés (MG)	18	C01 a C18
Córrego Florêncio (MG)	20	F01 a F20
Rio Vermelho (MG)	19	R01 a R19
Anchieta (ES)	16	A01 a A16

3.6.3.1 - RAPD

A variabilidade genética intra e interpopulacional dos moluscos foram avaliadas utilizando a técnica de RAPD (Polimorfismo de DNA amplificado aleatoriamente). O protocolo dessa técnica foi semelhante ao utilizado por Cardoso et al. (2006). Um teste de reprodutibilidade foi realizado para assegurar que os produtos da amplificação mantinham-se constantes independente do termociclador utilizado. Para esse teste, um “mix” da reação da PCR foi distribuído em três alíquotas contendo o mesmo DNA, os quais foram processados em três termocicladores diferentes e posteriormente aplicados em um mesmo gel para comparação. Não foi observada variação entre as diferentes amostras. Foram realizados testes com quatro iniciadores (3302, 3303, 3304 e 3307) para seleção daqueles que produzissem os perfis mais simples, de fácil visualização (nítidas e distinguíveis) e reprodutíveis. Somente três apresentaram perfis de amplificação satisfatórios: 3302 (5' CTGATGCTAC 3'), 3304 (5' GCACTGTCA 3') e 3307 (5' AGTGCTACGT 3').

O programa utilizado para a amplificação (Dias Neto et al. 1993) consistiu em 35 ciclos de amplificação: desnaturação inicial a 95° C por 5 min, anelamento dos iniciadores a 30°C por 2 min e extensão a 72° C por 1 min; segundo ciclo foi idêntico ao primeiro, exceto pelo tempo de desnaturação que foi alterado para 30 seg. Nos 33 ciclos subsequentes, o tempo de desnaturação manteve-se em 30 seg e a temperatura de anelamento alterada para 40° C; no último ciclo a temperatura de extensão foi alterada para 5 min. Em cada reação utilizou-se sempre um controle negativo (sem adição de DNA) para verificar a qualidade da reação. O DNA dos indivíduos de uma mesma população foram amplificados em uma mesma reação e visualizados em um mesmo gel sempre na mesma ordem independente do iniciador utilizado. A fim de possibilitar comparações precisas entre os diferentes géis nas análises interpopulacionais, quatro indivíduos de cada população foram submetidos a uma mesma reação de PCR e em seguida a uma mesma eletroforese para assegurar maior confiabilidade

na comparação e no estabelecimento da presença ou ausência das bandas. Os resultados foram visualizados utilizando eletroforese em géis de poliacrilamida a 6%, corados pela prata (Santos et al. 1993). O tamanho das bandas foi determinado por comparação com um padrão de peso molecular (Phi X 174 - *Hae*III). Os resultados foram registrados com câmera digital MAVICA da Sony.

Tabela 3: Protocolo utilizado na reação de RAPD

Reagentes	Concentração
Iniciador	6,4 pmol
DNA molde	10 a 20 ng
dNTPs	200 mM de dCTP, dATP, dGTP, dTTP
<i>Taq</i> DNA Polimerase (Promega)	1,0 unidade
Tampão (Promega)	20 mM de Tris-HCK pH 8; 100 mM de KCL; 0,1 mM EDTA
MgCl ₂ (Promega)	1,5 mM de MgCl ₂
Volume final	10 µl
Óleo Mineral	20 µl

Os perfis de bandas gerados nos géis foram considerados para análise de distância genética entre os moluscos. Para calcular a distância genética, os géis foram analisados sobre um negatoscópio, onde as bandas de uma canaleta do gel foram comparadas com todas as outras canaletas do mesmo gel. Foi construída uma matriz fenotípica composta de zero e um, sendo zero correspondente à ausência da banda e um à presença. A matriz final (todos os iniciadores) foi construída a partir de sub-matrizes obtidas para cada iniciador separadamente. A distância genética foi calculada usando o coeficiente de Nei & Li (1979). Os dados foram agrupados pelo método de Neighbor-joining - NJ (Saitou & Nei 1987) e utilizados para construção de uma árvore de distância genética com o auxílio do programa TREECON para Windows (Version 1.2 - Van de Peer & De Wachter 1994). Para confirmar

a árvore gerada pelo NJ foi aplicado o método estatístico de “bootstrap” (Felsenstein 1985) com 1.000 pseudo-replicações.

4.1 - Levantamento malacológico

Foi constatada a ocorrência de um grande número de moluscos do gênero *Biomphalaria* no distrito de Ravena. Entre as dez coleções hídricas, em sete foram encontrados moluscos: Rio Vermelho, Córrego Florêncio, Poço artesiano, Lagoa da Cotochés, Córrego Lavapés, Poço ao lado do córrego Lavapés e Vala 1. Foram capturados um total de 3.451 exemplares. Na Tabela 4 pode-se observar o número de moluscos coletados de acordo com a coleção hídrica e o mês.

4.2 - Exame de moluscos

Nenhum dos moluscos capturados em Ravena eliminou cercária de *S. mansoni* (Figura 19A). Entretanto foi possível constatar a presença de cercárias de outros trematódeos (Tabela 3). Foram encontradas *Cercaria caratinguensis* (Strigeidae) (Figura 19B), *Cercaria ocellifera* (Clinostomatidae) (Figura 19C), que possuem cauda bifurcada, e também *Cercaria macrogranulosa* (Echinostomatidae) (Figura 19D), que não possui cauda bifurcada.

Um total de 73 moluscos da Lagoa da Cotochés e do Córrego Lavapés eliminaram *Cercaria caratinguensis*. A *Cercaria ocellifera* foi encontrada em 88 moluscos da Lagoa da Cotochés. Já a *Cercaria macrogranulosa* foi encontrada em 19 exemplares da Lagoa da Cotochés, Córrego Florêncio, Córrego Lavapés e no Poço ao lado do córrego Lavapés. Os exemplares da Lagoa da Cotochés também apresentaram 116 moluscos eliminando concomitantemente *Cercaria ocellifera* e *Cercaria caratinguensis*. Entretanto, somente 1 exemplar do Córrego Lavapés eliminou concomitantemente *Cercaria ocellifera* e *Cercaria macrogranulosa* (Tabela 5).

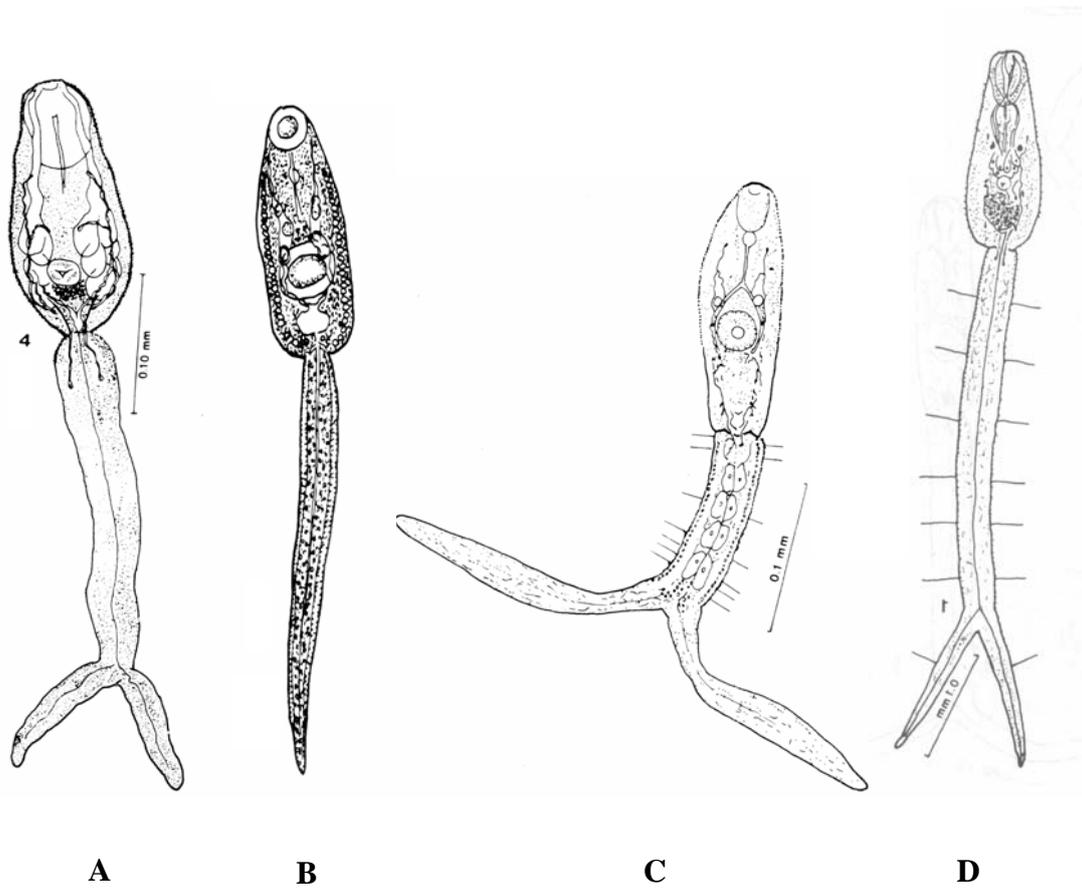


Figura 19: Desenho ilustrativo das cercárias de *S. mansoni* (A) Fonte Ruiz 1953; *Cercaria macrogranulosa* (B) Fonte: Ruiz 1952; *Cercaria caratinguensis* (C) Fonte: Ruiz 1953; *Cercaria ocellifera* (D) Fonte: Ruiz 1953.

Tabela 4: Número de exemplares de *Biomphalaria* coletados de acordo com a coleção hídrica e o mês (2005).

Coleção hídrica	Mês de coleta												
	Janeiro		Fevereiro		Março		Abril		Maio		Junho		TOTAL
	Espécie	Nº											
Lagoa da Cotochés	<i>B. tenagophila</i>	271	<i>B. tenagophila</i>	219	<i>B. tenagophila</i>	354	<i>B. tenagophila</i>	144	<i>B. tenagophila</i>	192	<i>B. tenagophila</i>	459	
Córrego Florêncio	<i>B. tenagophila</i>	514	<i>B. tenagophila</i>	464	<i>B. tenagophila</i>	161	<i>B. tenagophila</i>	109	<i>B. tenagophila</i>	65	<i>B. tenagophila</i>	54	1367
Rio Vermelho	<i>B. tenagophila</i>	05	<i>B. tenagophila</i>	02	-	-	-	-	<i>B. tenagophila</i>	44	<i>B. tenagophila</i>	33	84
Vala 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>B. tenagophila</i>	04	04
Córrego Lavapés	<i>B. glabrata</i>	12	<i>B. glabrata</i>	43	<i>B. glabrata</i>	26	<i>B. glabrata</i>	06	<i>B. glabrata</i>	97	<i>B. glabrata</i>	116	300
Poço ao lado do córrego Lavapés	<i>B. glabrata</i>	26	<i>B. glabrata</i>	15	<i>B. glabrata</i>	03	-	-	<i>B. glabrata</i>	01	<i>B. glabrata</i>	01	46
Poço artesiano	<i>B. glabrata</i>	06	<i>B. glabrata</i>	04	-	-	-	-	<i>B. glabrata</i>	01	-	-	11

Tabela 5: Tipos de cercárias encontradas durante o exame dos moluscos coletados em Ravena.

Criadouro	Moluscos		Tipo de cercária encontrada
	Espécie	Nº	
Lagoa da Cotochés	<i>B. tenagophila</i>	70	<i>Cercaria caratinguensis</i>
		88	<i>Cercaria ocellifera</i>
		116	<i>Cercaria ocellifera</i> e <i>Cercaria caratinguensis</i>
		01	<i>Cercaria macrogranulosa</i>
Córrego Florêncio	<i>B. tenagophila</i>	12	<i>Cercaria macrogranulosa</i>
Rio Vermelho	-	-	-
Vala 1	-	-	-
Córrego Lavapés	<i>B. glabrata</i>	03	<i>Cercaria caratinguensis</i>
		01	<i>Cercaria macrogranulosa</i>
		01	<i>Cercaria macrogranulosa</i> e <i>Cercaria ocellifera</i>
Poço ao lado do córrego Lavapés	<i>B. glabrata</i>	05	<i>Cercaria macrogranulosa</i>
Poço artesiano	-	-	-

4.3 - Identificação morfológica

Através da comparação dos caracteres da concha, aparelho reprodutor masculino e feminino, e do sistema excretor, conforme estabelecido por Deslandes (1951) e Paraense (1975, 1981, 1984, 1988) foram identificadas duas espécies: *B. glabrata* e *B. tenagophila*. Entre os 3.451 espécimes coletados, 357 foram identificadas como *B. glabrata* e 3.094 como *B. tenagophila*.

4.4 - Identificação molecular

A amplificação da região espaçadora transcrita interna (ITS) do gene do RNA ribossomal utilizando os iniciadores ETTS1 (5'-GCTTAAGTTCAGCGGGT-3') e ETTS2 (5'-TAACAAGGTTTCCGTAGGTGAA-3') (Kane & Rollinson 1994) gerou fragmentos de aproximadamente 1300 pb para todos os espécimes de *Biomphalaria* analisados. Após a restrição deste fragmento com a enzima *DdeI* os perfis obtidos foram correspondentes à *B. glabrata* e *B. tenagophila* de acordo com o diagrama elaborado por Vidigal et al. (2000). Os exemplares de *B. tenagophila* apresentaram um perfil de restrição com 2 fragmentos de aproximadamente 800 e 470 pb e os exemplares de *B. glabrata* apresentaram um perfil de restrição com 3 fragmentos de aproximadamente 500, 220 e 80 pb (Figura 20).

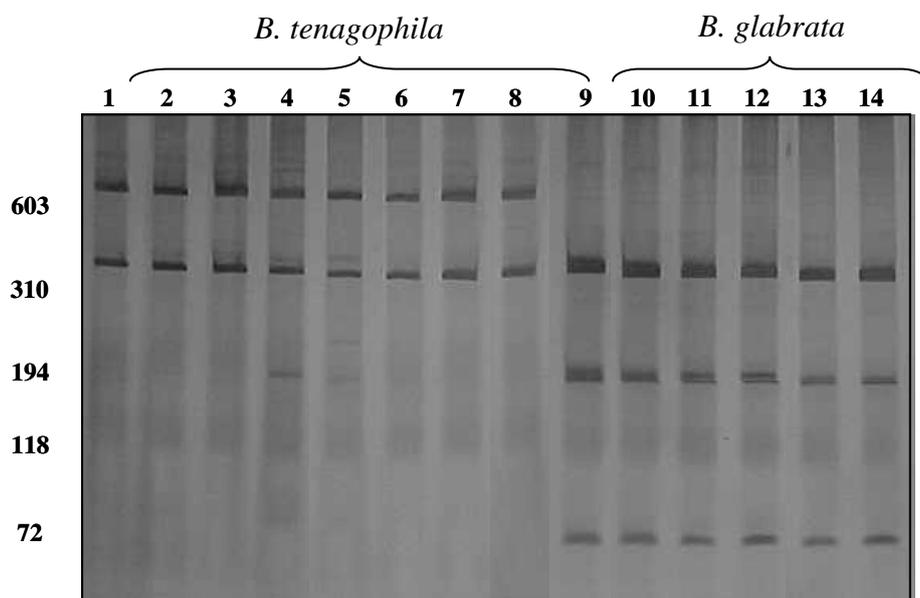


Figura 20: Gel de poliacrilamida 6% mostrando o perfis de PCR-RFLP obtidos pela digestão da região ITS de DNAr com a enzima *DdeI* dos moluscos provenientes do sete pontos de coleta em Ravena (Sabará-MG). Canaletas 1 e 2: Lagoa da Cotochés; Canaletas 3 e 4: Córrego Florêncio; Canaletas 5 e 6: Rio Vermelho; Canaletas 7 e 8: Vala 1; Canaletas 9 e 10: Córrego Lavapés; Canaletas 11 e 12: Poço ao lado do Córrego Lavapés; Canaletas 13 e 14: Poço artesiano.

4.5 - Infecção experimental

Os indivíduos da geração F1 provenientes de três diferentes pontos de coleta foram submetidos à infecção, como descrito no item 3.5.3. Como podemos observar na Tabela 6, os exemplares de *B. tenagophila* dos três pontos mostraram-se suscetíveis à cepa SJ de *S. mansoni*. As taxas de infecção foram de 5% para a Lagoa da Cotochés, 3,8% para o Córrego Florêncio, 4% para o Rio Vermelho e 81,6% para *B. glabrata* - grupo controle - Barreiro.

Tabela 6: Infecção experimental de *B. tenagophila* utilizando miracídios de *S. mansoni* da cepa SJ.

Coleção hídrica	Espécie	Nº de moluscos expostos	Diâmetro (mm)	Nº de miracídios/molusco	Nº de moluscos sobreviventes	Nº de moluscos positivos	% de infecção
Lagoa da Cotochés	<i>B. tenagophila</i>	100	8-10	50	99	5	5,0
Lagoa da Cotochés (controle)	<i>B. tenagophila</i>	30	8-10	-	28	-	-
Córrego Florêncio	<i>B. tenagophila</i>	100	8-10	50	78	3	3,8
Córrego Florêncio (controle)	<i>B. tenagophila</i>	30	8-10	-	27	-	-
Rio Vermelho	<i>B. tenagophila</i>	100	8-10	50	99	4	4,0
Rio Vermelho (controle)	<i>B. tenagophila</i>	30	8-10	-	21	-	-
Barreiro	<i>B. glabrata</i>	100	8-10	20	38	31	81,6
Barreiro (controle)	<i>B. glabrata</i>	30	8-10	-	28	-	-

4.5 – Variabilidade genética

4.5.1 - Intrapopulacional

Os três iniciadores utilizados (3302, 3304 e 3307) produziram um total de 54 marcadores analisáveis para *B. tenagophila* de Taim/RS, 40 para os da Lagoa da Cotochés/MG, 43 para os do Córrego Florêncio/MG, 41 para os do Rio Vermelho/MG e 39 para os de Anchieta/ES, com tamanhos que variaram de 310 a 872 pares de base (Figuras 21, 22, 23, 24, e 25). O número de bandas analisadas variou de acordo com o iniciador. O iniciador que produziu maior variação foi o 3307, com 47% de bandas polimórficas (Tabelas 7, 8 e 9).

Tabela 7: População estudada, número de bandas analisadas, bandas polimórficas, bandas monomórficas e tamanho dos fragmentos produzidos pelo iniciador 3302.

População	Bandas			
	Analisadas	Polimórficas (%)	Monomórficas (%)	Tamanho (pb)
Taim/RS	16	1(6)	15(94)	310 a 872
Lagoa da Cotochés/MG	13	3(23)	10(77)	310 a 872
Córrego Florêncio/MG	14	0	14(100)	310 a 872
Rio Vermelho/MG	12	3(25)	9(75)	310 a 872
Anchieta/ES	14	4(29)	10(71)	350 a 872

Tabela 8: População estudada, número de bandas analisadas, bandas polimórficas, bandas monomórficas e tamanho dos fragmentos produzidos pelo iniciador 3304.

População	Bandas			
	Analisadas	Polimórficas (%)	Monomórficas (%)	Tamanho (pb)
Taim/RS	19	3(16)	16(84)	310 a 872
Lagoa da Cotochés/MG	12	2(17)	10(83)	310 a 800
Córrego Florêncio/MG	16	0	16(100)	310 a 872
Rio Vermelho/MG	15	1(7)	14(93)	310 a 872
Anchieta/ES	11	1(9)	10(91)	350 a 872

Tabela 9: População estudada, número de bandas analisadas, bandas polimórficas, bandas monomórficas e tamanho dos fragmentos produzidos pelo iniciador 3307.

População	Bandas			
	Analisadas	Polimórficas %	Monomórficas %	Tamanho (pb)
Taim/RS	19	9(47)	10(53)	400 a 872
Lagoa da Cotochés/MG	15	6(40)	9(60)	310 a 800
Córrego Florêncio/MG	13	3(23)	10(77)	310 a 872
Rio Vermelho/MG	14	4(29)	10(71)	310 a 872
Anchieta/ES	14	4(31)	10(69)	350 a 872

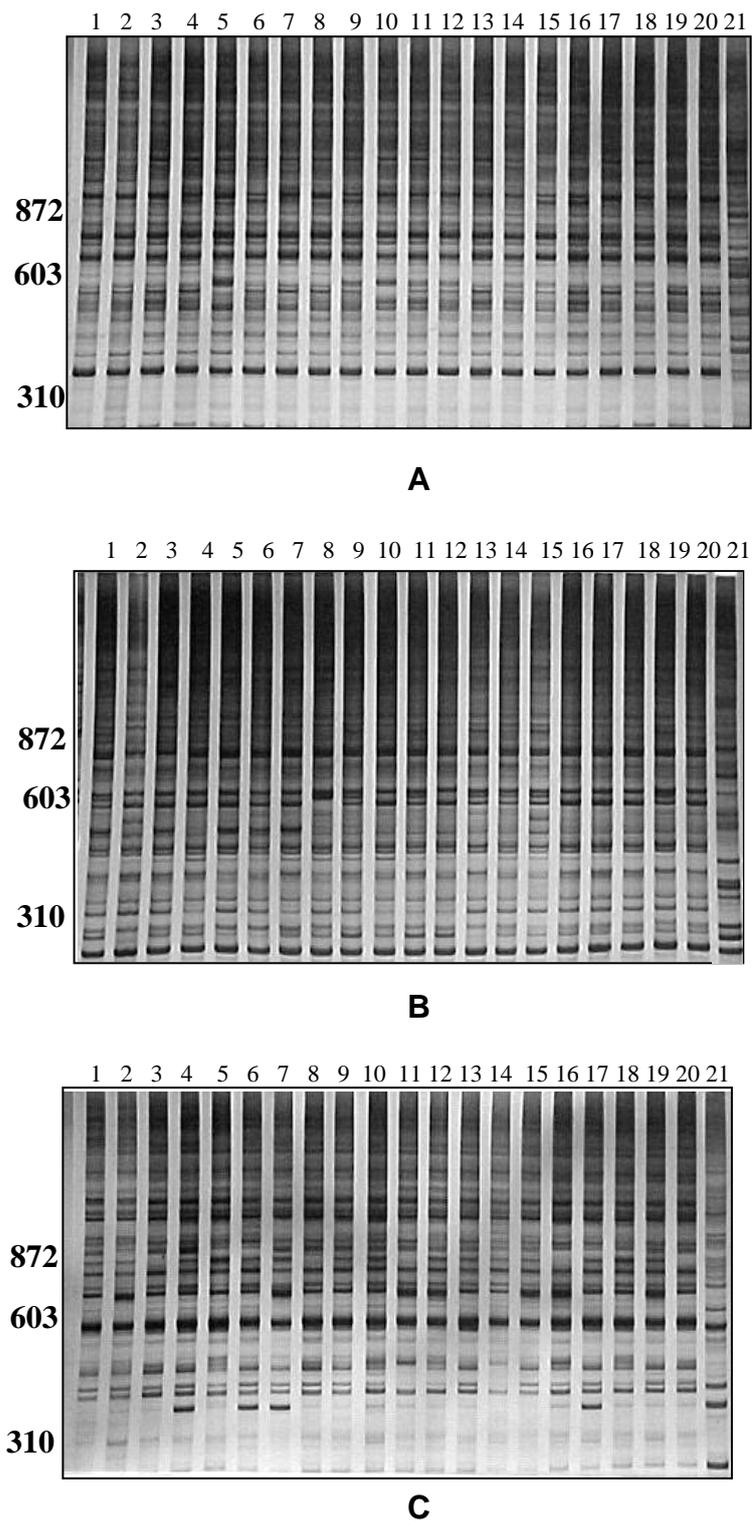


Figura 21: Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata mostrando os perfis de RAPD obtidos pelos iniciadores 3302 (A), 3304 (B) e 3307 (C), respectivamente, de 20 indivíduos de *B. tenagophila* do Taim/RS. Na canaleta 21 encontra-se o grupo externo (*B. t. guaibensis*). Marcadores de peso molecular estão mostrados a esquerda (Phi X 174).

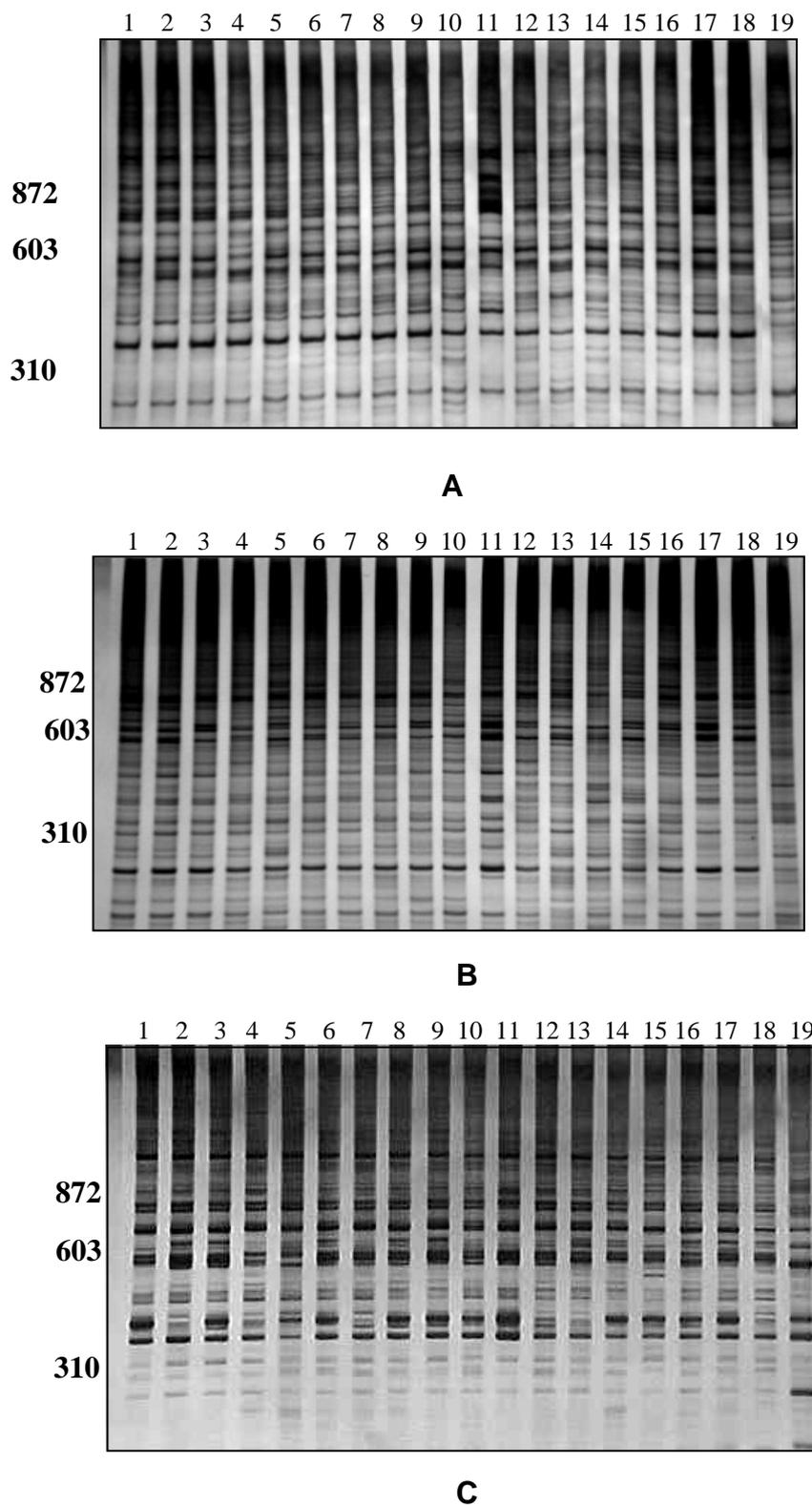


Figura 22: Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata mostrando os perfis de RAPD obtidos pelos iniciadores 3302 (A), 3304 (B) e 3307 (C), respectivamente, de 18 indivíduos de *B. tenagophila* da Lagoa da Cotochés/MG. Na canaleta 19 encontra-se o grupo externo (*B. t. guaibensis*). Marcadores de peso molecular estão mostrados a esquerda (Phi X 174).

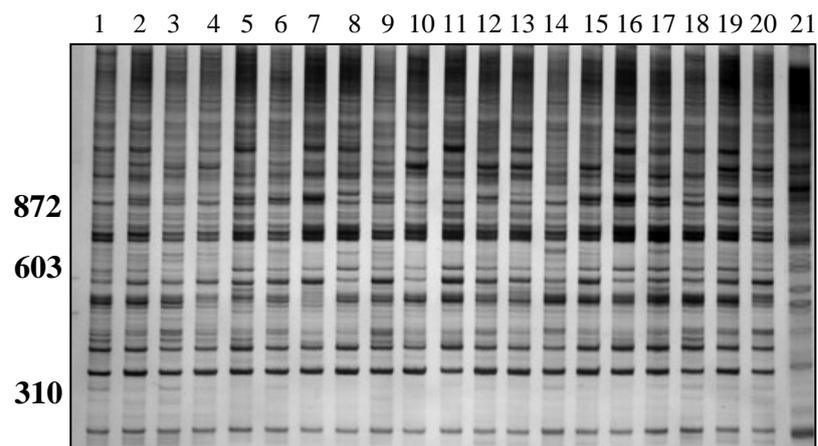
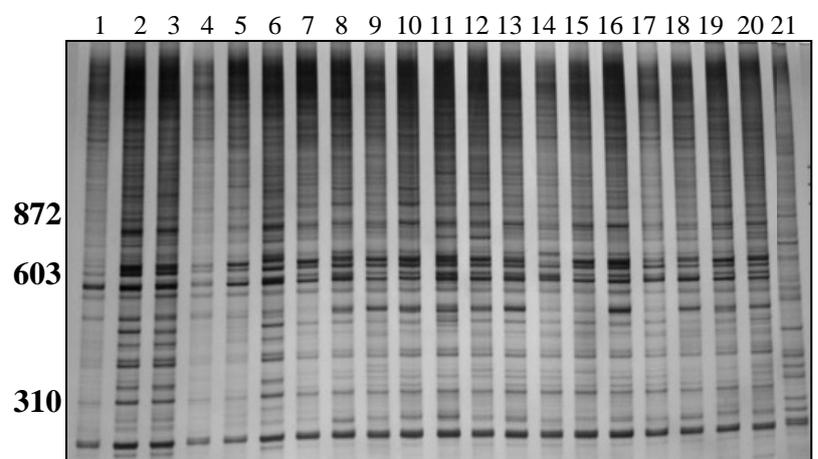
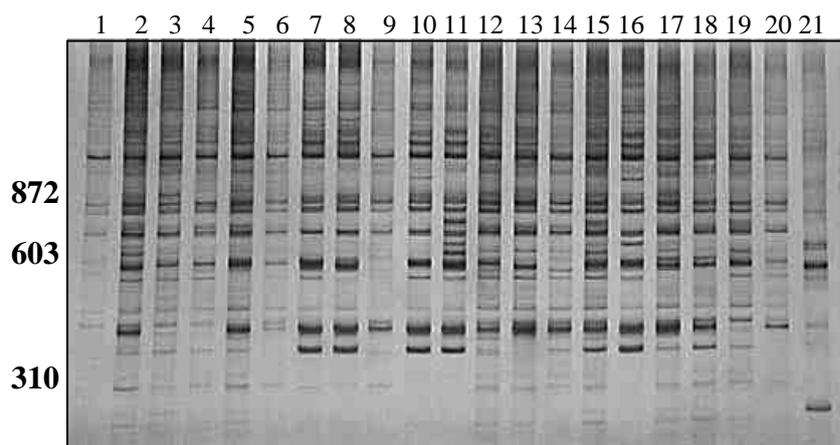
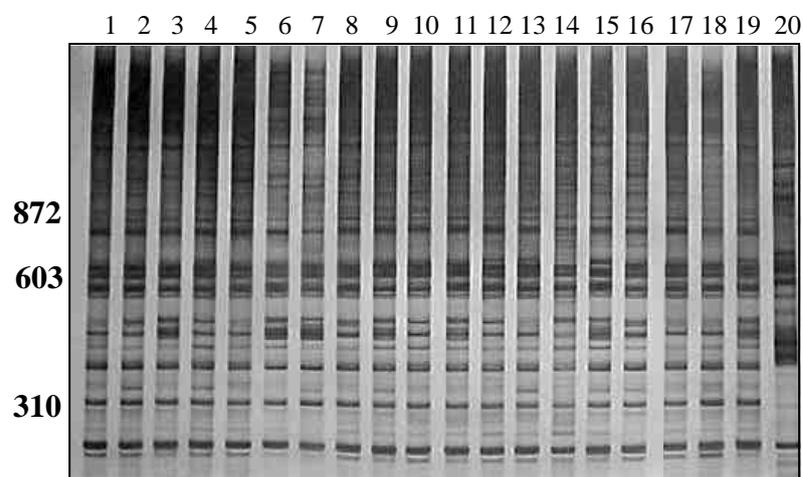
**A****B****C**

Figura 23: Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata mostrando os perfis de RAPD obtidos pelos iniciadores 3302 (A), 3304 (B) e 3307 (C), respectivamente, de 20 indivíduos de *B. tenagophila* do Córrego Florêncio/MG. Na canaleta 21 encontra-se o grupo externo (*B. t. guibensis*). Marcadores de peso molecular estão mostrados a esquerda (Phi X 174).



A



B



C

Figura 24: Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata mostrando os perfis de RAPD obtidos pelos iniciadores 3302 (A), 3304 (B) e 3307 (C), respectivamente, de 19 indivíduos de *B. tenagophila* do Rio Vermelho/MG. Na canaleta 20 encontra-se o grupo externo (*B. t. guaibensis*). Marcadores de peso molecular estão mostrados a esquerda (Phi X 174).

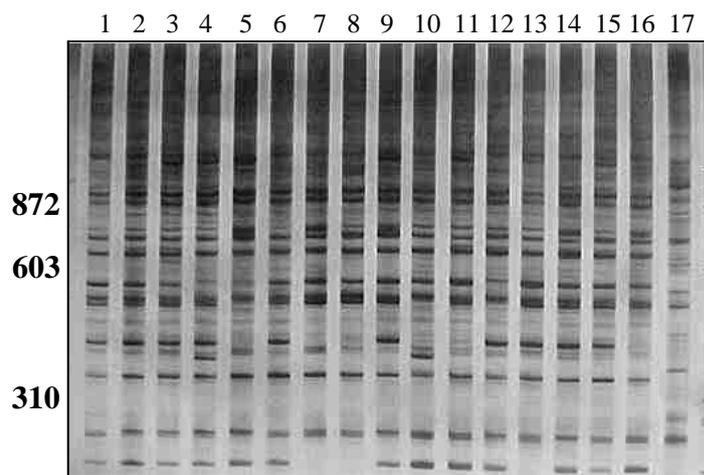
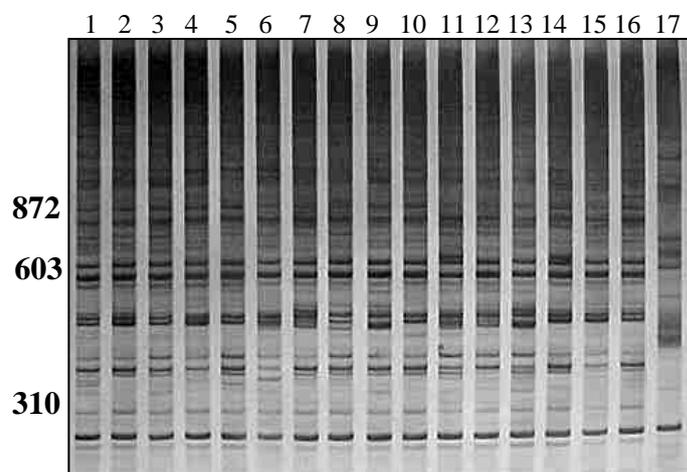
**A****B****C**

Figura 25: Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata mostrando os perfis de RAPD obtidos pelos iniciadores 3302 (A), 3304 (B) e 3307 (C), respectivamente, de 16 indivíduos de *B. tenagophila* de Anchieta/ES. Na canaleta 17 encontra-se o grupo externo (*B. t. guaiabensis*). Marcadores de peso molecular estão mostrados a esquerda (Phi X 174).

4.5.2 - Interpopulacional

Os três iniciadores produziram um total de 42 marcadores analisáveis, com tamanhos que variaram de 310 a 872 pares de base. O número de bandas analisadas variou de acordo com o iniciador, sendo o que produziu maior variação foi o 3307, com 50% de bandas polimórficas (Tabela 10). As Figuras 26, 27 e 28 mostram os produtos de amplificação de quatro exemplares de cada população de *B. tenagophila* obtidos, respectivamente, com os iniciadores 3302, 3304 e 3307.

Tabela 10: Número de bandas analisadas, bandas polimórficas, bandas monomórficas e tamanho dos fragmentos produzidos pelos iniciadores 3302, 3304 e 3307 respectivamente.

Iniciador	Bandas			
	Analisadas	Polimórficas (%)	Monomórficas (%)	Tamanho (pb)
3302	10	3(30)	7(70)	370 a 872
3304	16	7(44)	9(56)	310 a 872
3307	16	8(50)	8(50)	310 a 872

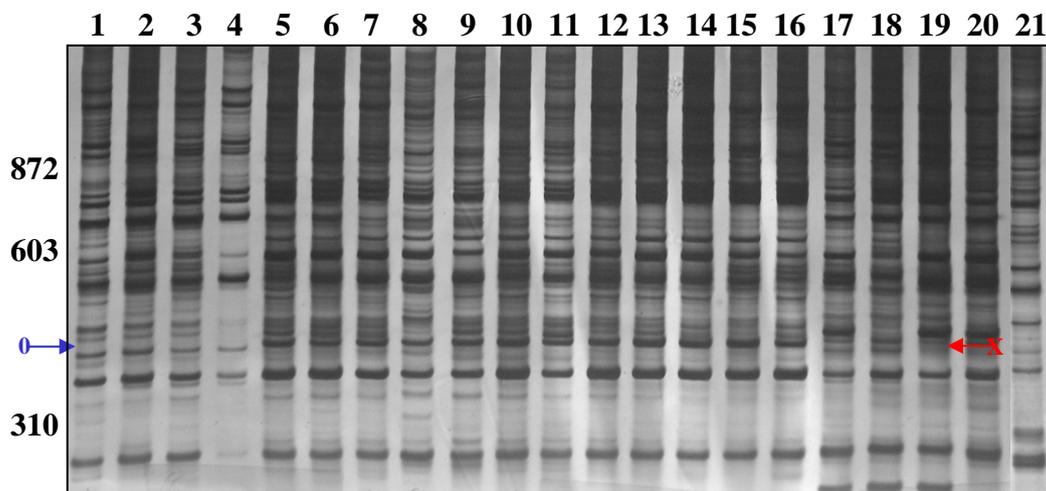


Figura 26: Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata mostrando os perfis de RAPD obtidos pelo iniciador 3302 de 20 indivíduos de *B. tenagophila*. Canaletas 1 a 4: exemplares do Taim/RS; 5 a 8: exemplares da Lagoa da Cotochés, Ravena/MG; 9 a 12: exemplares do Córrego Florêncio, Ravena/MG; 13 a 16: exemplares do Rio Vermelho, Ravena/MG; 17 a 20: exemplares de Anchieta/ES. Na canaleta 21 encontra-se o grupo externo (*B. t. guaiibensis*). Marcadores de peso molecular estão mostrados a esquerda (Phi X 174).

- 0 → Banda ausente somente nos indivíduos da população do Taim/RS.
- x → Banda presente somente nos indivíduos da população do Taim/RS.
- 0 → Banda ausente somente nos indivíduos da população de Anchieta/ES.
- x → Banda presente somente nos indivíduos da população de Anchieta/ES.

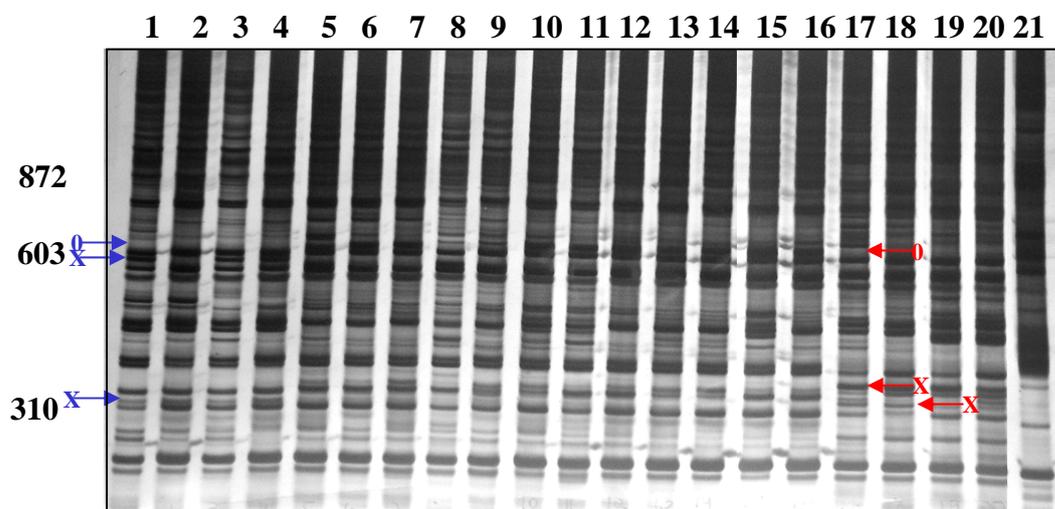


Figura 27: Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata mostrando os perfis de RAPD obtidos pelo iniciador 3304 de 20 indivíduos de *B. tenagophila*. Canaletas 1 a 4: exemplares do Taim/RS; 5 a 8: exemplares da Lagoa da Cotochés, Ravena/MG; 9 a 12: exemplares do Córrego Florêncio, Ravena/MG; 13 a 16: exemplares do Rio Vermelho, Ravena/MG; 17 a 20: exemplares de Anchieta/ES. Na canaleta 21 encontra-se o grupo externo (*B. t. guaibensis*). Marcadores de peso molecular estão mostrados a esquerda (Phi X 174).

- 0 → Banda ausente somente nos indivíduos da população do Taim/RS.
- X → Banda presente somente nos indivíduos da população do Taim/RS.
- 0 → Banda ausente somente nos indivíduos da população de Anchieta/ES.
- X → Banda presente somente nos indivíduos da população de Anchieta/ES.

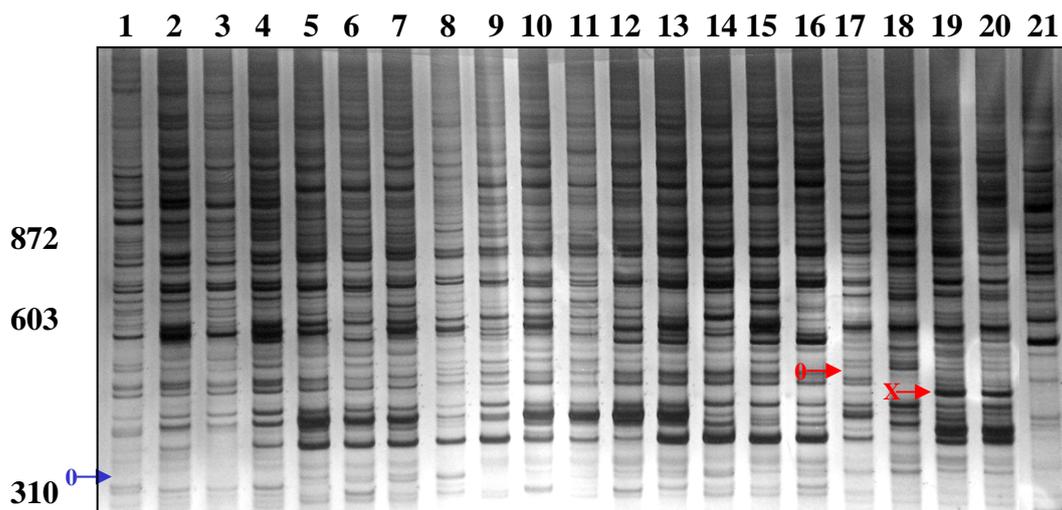


Figura 28: Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata mostrando os perfis de RAPD obtidos pelo iniciador 3307 de 20 indivíduos de *B. tenagophila*. Canaletas 1 a 4: exemplares do Taim/RS; 5 a 8: exemplares da Lagoa da Cotochés, Ravena/MG; 9 a 12: exemplares do Córrego Florêncio, Ravena/MG; 13 a 16: exemplares do Rio Vermelho, Ravena/MG; 17 a 20: exemplares de Anchieta/ES. Na canaleta 21 encontra-se o grupo externo (*B. t. guaibensis*). Marcadores de peso molecular estão mostrados a esquerda (Phi X 174).

- 0 → Banda ausente somente nos indivíduos da população do Taim/RS.
- X → Banda presente somente nos indivíduos da população do Taim/RS.
- 0 → Banda ausente somente nos indivíduos da população de Anchieta/ES.
- X → Banda presente somente nos indivíduos da população de Anchieta/ES.

A partir dos padrões de bandejamento das Figuras 26, 27 e 28, foi construído um dendograma para visualização da distância genética entre as diferentes populações (Figura 29). Também foram construídos dendogramas intrapopulacionais, entretanto estes não serão mostrados uma vez que todos os indivíduos agruparam-se em um mesmo ramo.

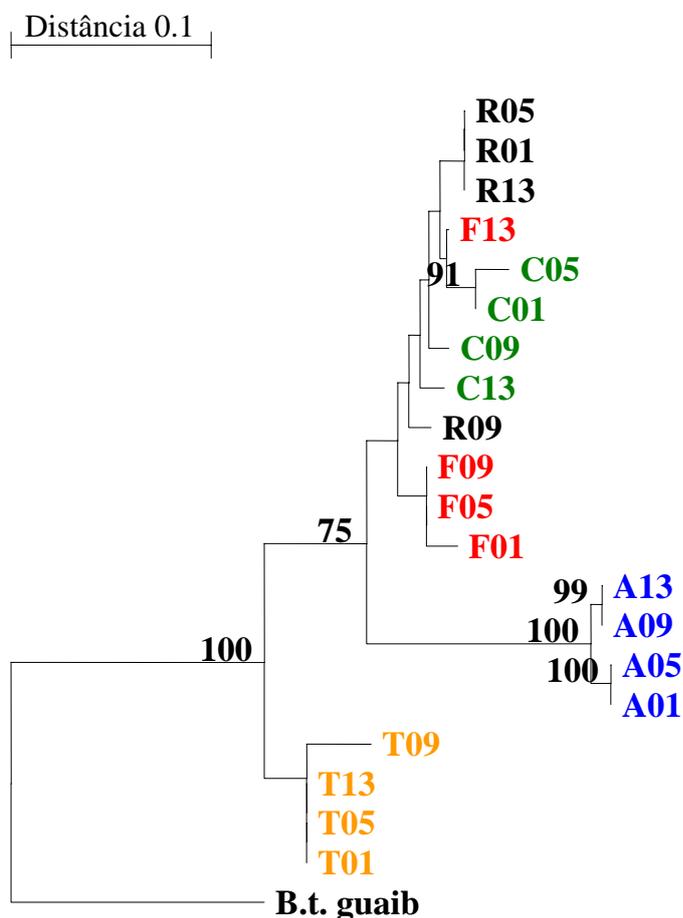


Figura 29: Dendograma Neighbor-Joining obtido a partir da análise dos perfis de RAPD das populações de *B. tenagophila* do Taim/RS (T01, T05, T09 e T13), de Anchieta/ES (A01, A05, A09 e A13), do Córrego Florêncio/MG (F01, F05, F09 e F13), da Lagoa da Cotochés/MG (C01, C05, C09 e C13) e do Rio Vermelho/MG (R01, R05, R09 e R13) produzidos com os iniciadores 3302, 3304 e 3307. Os números são valores de *bootstrap* (porcentagem) baseado em 1000 pseudo-replicações. A distância genética foi calculada usando o coeficiente de Nei & Li (1979).

O distrito de Ravena pertence ao município de Sabará, MG, e fica situado a 30 km de Belo Horizonte, às margens da BR262. Na região, existem diversos sítios e pousadas que servem de lazer, nos finais de semana, para pessoas que moram nas proximidades. De fato, a proximidade da capital e a facilidade de acesso, fazem com que este distrito seja muito procurado como área de turismo. Muitos desses sítios e pousadas estão localizados às margens de coleções hídricas, onde desembocam esgotos e, em alguns, existem piscinas que são abastecidas com água bombeada destas coleções. Assim, hospedeiros intermediários do *S. mansoni* presentes nessas coleções, podem ser introduzidos acidentalmente nestas piscinas e, caso estejam infectados, podem fechar o ciclo do parasito.

A área urbana do distrito é subdividida em três localidades: Ravenópolis, Ravena e Lavapés, possuindo um total de 2.293 habitantes, de acordo com o último censo do IBGE realizado no ano 2000. Em 1980, Coura-Filho et al. (1995) realizaram um trabalho sobre os determinantes ambientais da esquistossomose mansoni na área urbana, onde a prevalência da doença foi de 36,7%. Na época, a população era de 1.174 habitantes. Os determinantes de risco identificados para a transmissão da doença estavam relacionados aos hábitos de nadar e pescar em córregos e clubes recreativos localizados nos arredores. Neste mesmo ano, após a instalação do serviço de água tratada pela COPASA em 90% das residências, foram iniciados tratamentos quadrienais da população parasitada (em 1980, 1984, 1988 e 1995) (Coura-Filho et al. 1996). No decorrer do estudo, foi observada uma redução da prevalência para 11,5%.

No presente trabalho foi possível verificar, inicialmente, uma diminuição do número de coleções hídricas pesquisadas de 15 para oito em relação ao estudo feito em 1980 (Coura-Filho et al. 1996). Numa dessas coleções que era foco da esquistossomose (córrego Ravenópolis), foram construídas diversas casas, refletindo o crescimento da população urbana no distrito, que praticamente duplicou nos últimos 25 anos. Nas oito coleções re-visitadas no presente estudo, em sete havia sido registrada a presença de moluscos do gênero *Biomphalaria* em 1980 (Coura-Filho et al. 1996). Apesar da diminuição do número de coleções hídricas, foi registrada a presença de *Biomphalaria* em duas coleções que em 1980, não haviam sido encontrados: Córrego Florêncio e Vala 1. Nessa última, somente foram encontrados exemplares de *Biomphalaria* no último mês de coleta, pois esta vala estava seca durante os meses anteriores. Neste trabalho duas novas coleções hídricas foram adicionadas, denominada Poço ao Lado do Córrego Lavapés e Lagoa Nova, esta última construída recentemente por um morador dentro de sua propriedade.

Durante o levantamento malacológico realizado de maio a outubro/1980, foram coletados 8.989 espécimes do gênero *Biomphalaria*, sendo 3.812 exemplares de *B. glabrata* em 12 coleções hídricas e 5.177 de *B. tenagophila* em um único curso de água. No presente estudo, no qual as coletas foram realizadas de janeiro a junho/2005, foram coletados 3.451 exemplares de bionfalárias, sendo 357 *B. glabrata* em três coleções hídricas (Córrego Lavapés, Poço Artesiano e Poço ao lado do Córrego Lavapés) e 3.094 *B. tenagophila* em quatro (Lagoa da Cotochés, Córrego Florêncio, Rio Vermelho e Vala 1). A diminuição do número de moluscos, em relação a 1980, pode ser consequência de vários fatores, entre os quais podemos citar a redução no número de criadouros de 15 para 10 e, as coletas terem sido realizadas em diferentes épocas do ano. De fato, neste trabalho as coletas foram realizadas no período de janeiro a junho de 2005 em que os três primeiros meses corresponderam à estação chuvosa com índice de precipitação pluviométrica acima de 150 mm (Figura 30). Em estudo realizado no estado de Pernambuco, Pinotti et al. (1980) relatam que a maior quantidade de planorbídeos podia ser verificada após o término das estações chuvosas com um período, entre setembro e dezembro, no qual se observou um aumento populacional. Estes autores verificaram ainda que os picos populacionais destes planorbídeos ocorreram quando os índices pluviométricos encontravam-se abaixo de 100 mm (Figura 31).

Estes dados podem explicar o porquê do encontro de um maior número de moluscos em 1980, ocasião em que as coletas foram realizadas no período de maio a outubro. De fato, neste período o índice pluviométrico manteve-se abaixo de 50 mm (Figura 32). Podemos ainda verificar que em abril de 1980, um mês antes do início das coletas, foi registrado um índice acima de 200 mm, anormal para este mês (Figura 30) em comparação com o esperado (curva normal climatológica de 1961 até 1990).

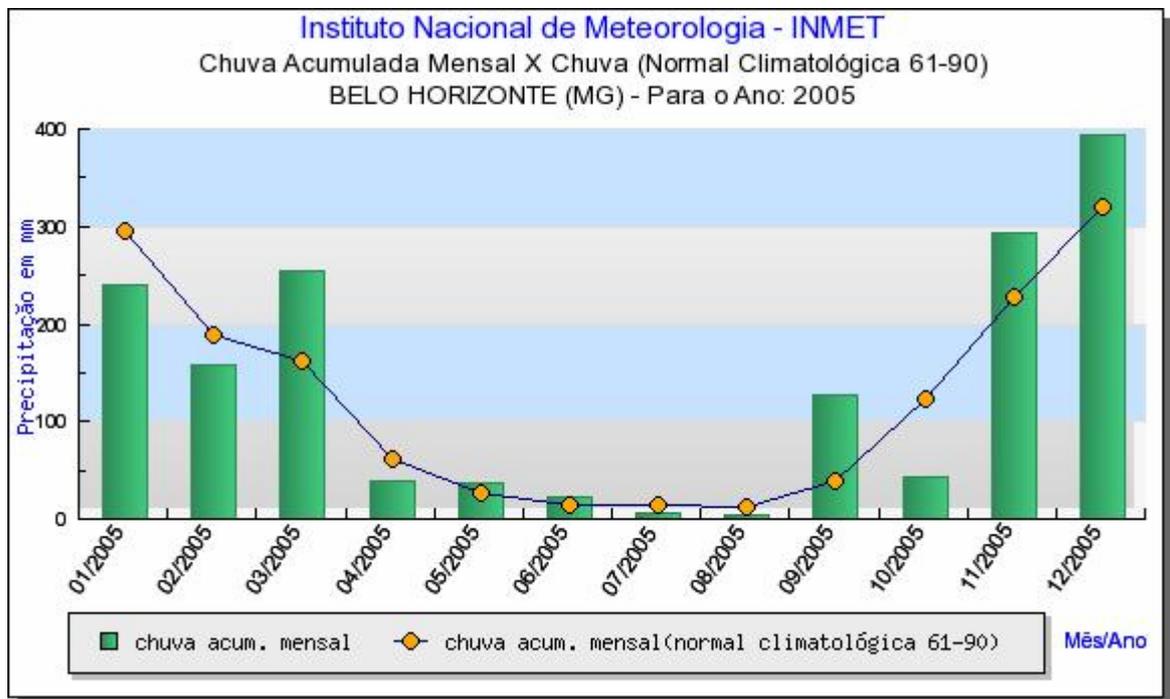


Figura 30: Dados pluviométricos de Belo Horizonte (2005).

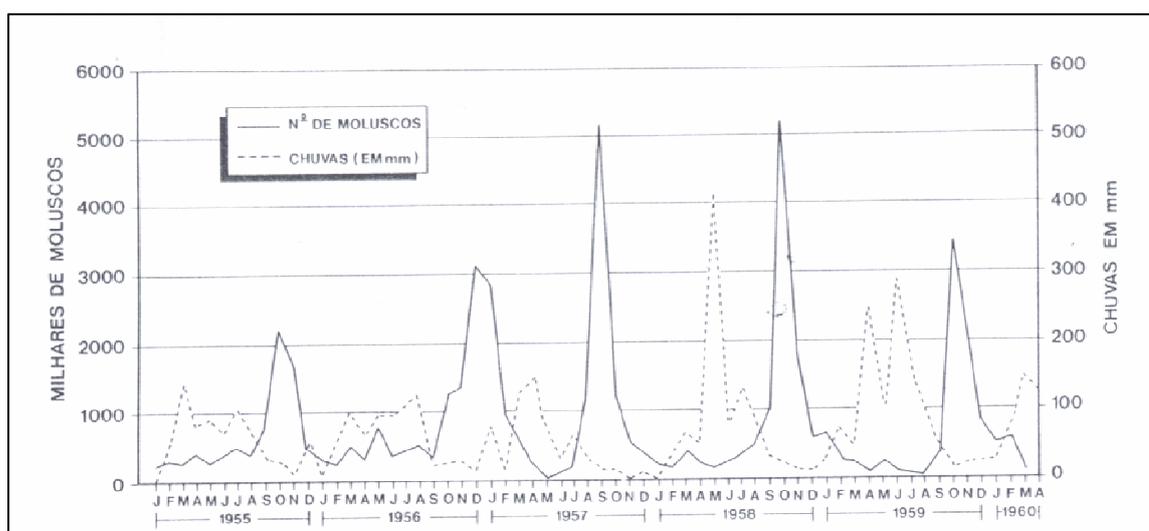


Figura 31: Dados pluviométricos do estado de Pernambuco (1955 a 1960).

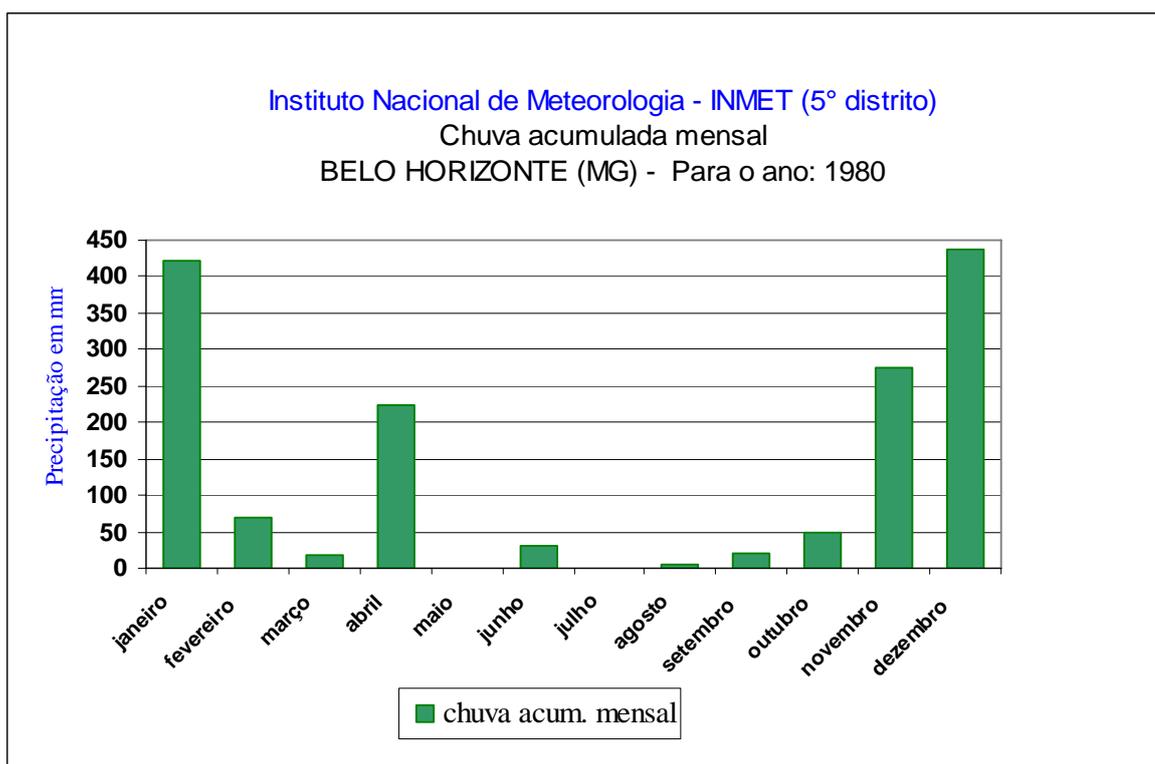


Figura 32: Dados pluviométricos de Belo Horizonte (1980)

Foi possível observar também que a *B. tenagophila* ampliou sua área de ocorrência, uma vez que esta só ocorria em uma única coleção hídrica (vala que não existe mais) e atualmente está presente em quatro coleções diferentes. O transporte passivo pelas correntes d'água pode ter ocorrido, uma vez que este representa o modo mais freqüente de dispersão dos planorbídeos, principalmente nas épocas de chuvas e inundações (Paraense 1970). A dispersão de moluscos também pode ser verificada passivamente, por meio de distribuição de peixes, plantas aquáticas ou por transporte de ovos e/ou moluscos por pássaros e mamíferos (Corrêa et al. 1970, 1980, Araújo & Santos 1982, Madsen & Frandsen 1989, Guimarães et al. 1990).

B. tenagophila foi encontrada em duas hídricas anteriormente habitadas por *B. glabrata*: Lagoa da Cotochés e Rio Vermelho. Observações semelhantes já haviam sido relatadas por outros autores. Paraense (1970) observou que uma população de *B. tenagophila* proveniente de São Paulo e introduzida em uma lagoa do bairro Baleia em Belo Horizonte, MG, substituiu em cerca de cinco anos uma população autóctone de *B. glabrata*. Observações semelhantes com *B. straminea* também foram feitas, onde esta espécie deslocou

B. glabrata em laboratório (Michelson e Dubois 1979) e também no campo, nos arredores de Recife, PE (Barbosa 1973). Kawazoe et al. (1980) também relatou que, num período de cinco anos, houve uma substituição de *B. glabrata* por *B. tenagophila* em um criadouro no município de Ourinhos, SP. Na Lagoa da Pampulha em Belo Horizonte, MG, foi relatada pela primeira vez a ocorrência de *B. tenagophila* por Milward-de-Andrade em 1972 onde anteriormente só havia *B. glabrata*. A partir de então, esta espécie foi continuamente sendo encontrada no local (Carvalho et al. 1975, Carvalho et al. 1985, Milward-de-Andrade e Carvalho 1978, Guimarães 1978, Carvalho e Guimarães 1984). O contrário ocorreu em Manguinhos, na cidade do Rio de Janeiro, onde Paraense (1970) relata que uma colônia de *B. glabrata* foi introduzida acidentalmente em 1917, em um criadouro de *B. tenagophila*, e excluiu a espécie autóctone daquele local. Esse autor levanta a hipótese da exclusão competitiva e sugere ainda que esta deva ser levada em conta como um dos fatores que influenciam a distribuição das populações hospedeiras intermediárias do *S. mansoni*. Não podemos excluir também a possibilidade de identificação equivocada dos moluscos coletados em 1980, uma vez que a identificação destes foi realizada utilizando apenas os caracteres morfológicos da concha.

De fato, a sistemática clássica desses moluscos baseia-se principalmente nos caracteres morfológicos da concha, aparelho reprodutor masculino e feminino e também do sistema excretor, conforme estabelecido por Deslandes (1951) e Paraense (1975, 1981, 1984, 1988). Entretanto, a identificação pode ser dificultada pela grande variação observada nesses caracteres devido ao seu estado de distensão no momento da fixação (Paraense 1975) ou também a variações morfológicas intraespecíficas (Paraense 1966). Em decorrência disso, foi elaborado a partir da técnica de PCR-RFLP direcionada para a região ITS do DNAr um diagrama esquemático com o perfil específico para as 10 espécies e uma subespécie do gênero *Biomphalaria* existentes no Brasil (Vidigal et al. 2000). Esse diagrama, vem sendo utilizado com sucesso, rotineiramente, para identificação destes moluscos no Laboratório de Referência Nacional para identificação de moluscos deste gênero. De fato, Paraense (2003) comenta que tanto a taxonomia morfológica quanto a molecular, atingem satisfatoriamente o mesmo objetivo, desde que aplicadas corretamente. Este autor afirma ainda que a taxonomia molecular pode ser superior à morfológica quando a segunda limita-se aos caracteres da concha, que estão sujeitos a diversas variações. Moritz & Hillis (1996) sugerem que a abordagem molecular pode ser útil em situações em que as variações morfológicas são limitadas. Esses autores ressaltam ainda que estudos que incorporam os dois tipos de análise

podem gerar dados que permitam a melhor interpretação e compreensão da diversidade biológica dos organismos em estudo. No entanto, é importante reconhecer que cada método tem suas vantagens e desvantagens. Portanto, todos os moluscos utilizados neste estudo foram identificados pelos caracteres morfológicos e pela PCR-RFLP direcionada para a região ITS do DNAr como *B. glabrata* e *B. tenagophila*.

Quanto a infecção pelo *S. mansoni*, em 1980, Coura-Filho et al. (1995) verificaram uma taxa de 1,5% de *B. glabrata* positivas, entretanto não observaram nenhum exemplar de *B. tenagophila* infectada. Com isto, Carvalho & Souza (1980) realizaram um estudo de suscetibilidade utilizando exemplares de *B. tenagophila* provenientes de Ravena/MG. Esses autores registraram uma taxa de infecção de 5% utilizando 200 miracídios da cepa LE de *S. mansoni*. Entretanto, Souza et al. (1983) encontraram resultados diferentes, pois não conseguiram infecção dos moluscos quando esses foram desafiados com três diferentes cepas (SJ, proveniente de São José dos Campos; LE, proveniente de Belo Horizonte; e SS, proveniente de Ravena), utilizando de 50 a 100 miracídios por molusco. Em virtude das divergências obtidas anteriormente, no presente estudo, testes de suscetibilidade foram realizados em *B. tenagophila* de três pontos diferentes do distrito. Utilizou-se a cepa SJ, devido a sua maior compatibilidade à *B. tenagophila* (Carvalho et al. 1979, Corrêa et al. 1979, Paraense & Corrêa 1963, Santos et al. 1979, Souza et al. 1983, 1987, 1995).

As taxas de infecção para os exemplares de *B. tenagophila* de Ravena, utilizando 50 miracídios por molusco, foram de 5%, 3,8% e 4% para a Lagoa da Cotochês, o Córrego Florêncio e o Rio Vermelho, respectivamente, com uma média de 4,3%. Apesar destes números, houve aumento da suscetibilidade dessa espécie na região em comparação com os estudos acima citados. Carvalho & Souza (1980) mesmo testando 50, 100 e 150 miracídios por molusco, somente obtiveram uma taxa de infecção de 5% quando aumentaram o número de miracídios para 200 e Souza et al. (1983) não conseguiram infecção, mesmo utilizando três cepas diferentes em quantidades que chegaram a 100 miracídios por molusco. A taxa de infecção destes moluscos, encontrada por Carvalho & Souza (1980) e também no presente trabalho, ainda sim é baixa quando comparada com estudos anteriores (Paraense & Corrêa 1978, Rosa et al. 2005, Souza et al. 1983, 1987, 1995).

Apesar de nenhum dos moluscos coletados em Ravena ter eliminado cercária de *S. mansoni*, foi possível constatar a presença de cercárias de outros trematódeos parasitas não humanos que também completam seus ciclos em moluscos de diversos gêneros (Souza et al. 1998). Em 297 moluscos (*B. tenagophila* e *B. glabrata*) foram encontradas *Cercaria caratinguensis*, *Cercaria ocellifera*, que possuem cauda bifurcada, e também *Cercaria*

macrogranulosa, que não possui cauda bifurcada. Dentre este total de moluscos que eliminaram cercárias, um número de 73 provenientes da Lagoa da Cotochés e do Córrego Lavapés eliminaram *Cercaria caratinguensis* e 88 da Lagoa da Cotochés eliminaram *Cercaria ocellifera*. A *Cercaria macrogranulosa* foi encontrada em um exemplar da Lagoa da Cotochés, 12 do Córrego Florêncio, um do Córrego Lavapés e cinco do Poço ao lado do córrego Lavapés. Os exemplares da Lagoa da Cotochés também apresentaram 116 moluscos eliminando concomitantemente *Cercaria ocellifera* e *Cercaria caratinguensis*. Entretanto, somente um exemplar do Córrego Lavapés eliminou concomitantemente *Cercaria ocellifera* e *Cercaria macrogranulosa*. Moluscos do gênero *Biomphalaria* provenientes do campo já foram anteriormente encontrados naturalmente infectados com estas cercárias. Souza et al. (1998) durante um levantamento malacológico realizado em 13 municípios da microrregião de Belo Horizonte, MG, encontraram *Cercaria caratinguensis*, *Cercaria ocellifera* e *Cercaria macrogranulosa* em *B. glabrata* e *B. tenagophila*. Espindola et al. (1992), estudando oito localidades de Santa Catarina, também verificaram a presença de *Cercaria ocellifera* e *Cercaria caratinguensis* em *B. tenagophila*. Milward-Andrade (1965) examinando *B. glabrata* de Belo Horizonte também verificou a presença de *Cercaria macrogranulosa* nestes moluscos. O conhecimento da ocorrência de cercárias de outros trematódeos nos moluscos do gênero *Biomphalaria* e a sua correta identificação são fatores de grande importância para que estas não sejam confundidas com as de *S. mansoni*, principalmente aquelas de calda bifurcada. Uma identificação incorreta dessas cercárias pode levar ao relato de um falso foco de esquistossomose.

Concluída a identificação e o exame dos moluscos coletados, foram iniciados os estudos de variabilidade genética utilizando a técnica de RAPD. Essa metodologia foi empregada com o intuito de avaliar a variabilidade genética inter e intapopulacional dos moluscos coletados nas três localidades de Ravena/MG (Ravena, Ravenópolis e Lava-pés) e compara-los a duas outras populações de *B. tenagophila* oriundas de Taim/RS e Anchieta/ES. A população do Taim tem se mostrado refratária ao *S. mansoni* durante mais de 20 anos. Esta cepa foi coletada pelo Professor José Rabelo Freitas (UFMG) e por várias vezes foi desafiada com diversas quantidades das diferentes cepas de *S. mansoni*. Entretanto, após várias visitas ao primeiro local da coleta, ainda não foi encontrado nenhum exemplar desta espécie. As únicas linhagens existentes estão no moluscário *Lobato Paraense* do CPqRR e no GIDE (Grupo Interdepartamental de Estudos sobre Esquistossomose) que fica localizado na UFMG em Belo Horizonte, MG. A população de Anchieta/ES foi coletada em Novembro de 2004 e obtidos moluscos da geração F1 para exposição à 50 miracídios da cepa SJ e 50 da cepa LE

de *S. mansoni*. Dos 200 moluscos desafiados (100/cepa) nenhum se mostrou suscetível ao *S. mansoni*. Novos estudos serão realizados para confirmar esses achados, entretanto, pelas observações de vários autores (Lewis et al. 2003, Paraense & Corrêa 1978, Souza et al. 1983, 1995, Zuim et al. 2005) o número de 50 miracídios é suficiente para infectar *B. tenagophila*. Ademais, foram utilizados como controle para verificação da eficiência dos miracídios, 200 exemplares de *B. glabrata* (100/cepa) que apresentaram mais de 90% de infecção. Além da escolha dessas duas populações, foi utilizado um exemplar de *B. tenagophila guaibensis* como grupo externo de comparação (*outgroup*). É de fundamental importância uma escolha correta do *outgroup*, pois a maioria dos programas que produzem dendogramas geram árvores sem raiz (*unrooted tree*), isto é, sem polarização dos ramos. Porém, a definição de uma raiz é importante para que os OTUs tenham um direcionamento para se agruparem. Como um método de definição de “raiz” inclui-se um ou mais *taxa* considerados como fora de um suposto grupo monofilético, esses *taxa* são denominados *outgroup* (referência externa). Entretanto, a escolha de um *outgroup* inadequado pode gerar erros na análise se este for muito distante do grupo em estudo. Em virtude disso, *B. t. guaibensis* foi escolhida como *outgroup*, pois é a única subespécie do gênero. Esta subespécie é praticamente indistinguível de *B. tenagophila* pela maioria dos caracteres morfológicos (Paraense 1984). Ambas são muito similares a *B. occidentalis* (Paraense 1981), entretanto somente a *B. t. tenagophila* é suscetível ao *S. mansoni* (Paraense e & Corrêa 1987). Foi demonstrado por Spatz et al. (1998, 1999), que *B. tenagophila tenagophila*, *B. tenagophila guaibensis* e *B. occidentalis* possuem uma alta similaridade genética e sugeriram o agrupamento dessas espécies em um complexo denominado complexo *B. tenagophila*. Estes autores sugeriram ainda que a subespécie *B. t. guaibensis* está mais relacionada à *B. occidentalis* do que a *B. t. tenagophila*.

No estudo de variabilidade genética intrapopulacional, os três iniciadores produziram um total de 44 marcadores analisáveis para os moluscos do Taim/RS, 40 para os da Lagoa da Cotochês/MG, 43 para os do Córrego Florêncio, 41 para os do Rio Vermelho e 38 para os de Anchieta, com tamanhos que variaram de 310 a 872 pares de base. O número de bandas analisadas variou de acordo com o iniciador. Aquele que produziu maior variação foi o 3307, com 47% de bandas polimórficas. Apesar dessa porcentagem, a maioria das bandas polimórficas encontradas refletiam a ausência de uma banda em um ou outro indivíduo. Com isso, os dados obtidos com os três iniciadores mostraram um perfil de bandeamento muito semelhante, e o percentual médio de bandas compartilhadas entre os exemplares da mesma localidade foi de 93%, 73%, 93%, 80% e 79% para as populações do Taim/RS, Lagoa da

Cotochés/MG, Córrego Florêncio, Rio Vermelho e Anchieta, respectivamente. Vidigal et al. (1994) estudando *B. glabrata* de várias localidades do Brasil através da técnica de RAPD, também encontraram uma baixa variabilidade intrapopulacional. Em estudo semelhante, Campos et al. (2002) estudando *B. glabrata* de oito localidades do Brasil através da técnica de PCR ancorado a repetições de seqüências simples (SSR-PCR), obtiveram estes mesmos resultados.

No estudo da variabilidade genética interpopulacional, os três iniciadores produziram um total de 42 marcadores analisáveis, com tamanhos que variaram de 310 a 872 pares de base. O número de bandas analisadas variou de acordo com o iniciador e aquele que produziu maior variação foi o 3307, com 50% de bandas polimórficas. Os dados obtidos com os três iniciadores mostraram um percentual médio de bandas compartilhadas de 19%. O dendograma construído a partir destes dados confirmou esta alta variabilidade interpopulacional, agrupando indivíduos da mesma localidade em ramos diferentes. Foi possível verificar a formação de três grupos: 1) Ravena/MG, 2) Anchieta/ES e 3) Taim/RS. Estes grupos estão apoiados pelos valores de *bootstrap* mostrado nos ramos da árvore obtida com NJ (de 75% a 100%). De fato, segundo Hillis & Bull (1993), através de estudos de simulação propuseram valores de 70% de “bootstrap” como limiar de significância. Estes dados corroboram com os obtidos por Caldeira et al. (2001) que, utilizando a técnica de SSR-PCR para analisar a variabilidade de diferentes populações do complexo *B. straminea* (*B. straminea*, *B. intermedia* e *B. kuhniiana*), observaram uma maior variabilidade interpopulacional. Resultados semelhantes foram obtidos por Cardoso et al. (2006) em estudo das populações brasileiras de *L. columella* através da técnica de RAPD. Esta mesma técnica foi utilizada por Rosa et al. (2005) em busca de marcadores genéticos associados à resistência nos descendentes F2 resistentes e suscetíveis resultantes do cruzamento entre *B. tenagophila* do Taim/RS (resistente) e *B. tenagophila* Joenville (suscetível). Estes autores encontraram 22 marcadores, entretanto, a maioria deles não tinha ligação com resistência ou suscetibilidade. A princípio, foi encontrada uma banda de 1000pb nos indivíduos suscetíveis, mas após sequenciamento foi verificado que esta pertencia ao *S. mansoni*.

Este limitado índice de variabilidade intrapopulacional encontrado nos trabalhos acima citados, indica a existência de um fluxo gênico entre os exemplares da mesma localidade, o que mantém uma homogeneidade genética nestes indivíduos. De fato a dinâmica populacional é um fator que pode contribuir na variabilidade genética destes moluscos. Estes podem ser submetidos a pressões seletivas tal como o efeito de gargalo (afunilamento ou *boottleneck*) que pode afetar o tamanho efetivo de uma população e reduzir o número de

indivíduos capazes de mantê-la (Futuyma 1997). Com isso, a recomposição das populações que sofreram este efeito ocorre a partir de poucos indivíduos sobreviventes, reduzindo assim a variabilidade genética da população.

Os moluscos de Anchieta/ES, apesar de terem se mostrado resistentes a infecção com *S. mansoni*, agruparam-se em um ramo mais próximo dos indivíduos de Ravena do que da população do Taim/ES. Este resultado pode ser em decorrência da última ser mantida a mais de 25 anos em laboratório ou mesmo um reflexo da maior distância geográfica do Rio Grande do Sul em relação a Minas Gerais.

Os resultados obtidos neste estudo refletem a premissa da técnica de RAPD, a qual permite gerar uma grande quantidade de polimorfismo de segmentos de DNA distribuídos por todo genoma (Ferreira & Grattapaglia 1998). Portanto marcadores de resistência ou suscetibilidade, que podem estar ligados a um ou mais genes, dificilmente seriam refletidos com esta ampla variedade de locus. No presente trabalho, não tivemos a intenção de buscar estes marcadores, mas sim de verificar a distância genética entre três populações: uma sabidamente resistente (Taim/RS), outra sabidamente suscetível (Ravena/MG) e uma terceira até o momento refratária ao *S. mansoni* (Anchieta/ES). Com isso, a técnica de RAPD se mostrou adequada para alcançar os objetivos propostos neste estudo.

Apesar dos moluscos coletados estarem negativos para *S. mansoni*, isto não determina que o distrito esteja livre da parasitose, pois mais moluscos precisam ser coletados e examinados e o levantamento da prevalência no município necessita ser concluído. Esta é uma área que deve ser constantemente vigiada, pois como foi demonstrado nos testes de suscetibilidade, os moluscos *B. tenagophila* estão se tornando cada vez mais suscetíveis.

- Foram pesquisadas dez coleções hídricas no município de Ravena, em três não houve registro de moluscos, em quatro foi registrada a presença de *Biomphalaria tenagophila*, em três *B. glabrata*.
- Os moluscos do gênero *Biomphalaria* pertencentes nas quatro coleções hídricas apresentaram cercarias: *Cercaria caratinguensis*, *C. ocellifera* e *C. macrogranulosa*.
- Comparando esse estudo ao realizado em 1980, houve uma dispersão ou introdução de *B. tenagophila* em algumas coleções hídricas, substituindo *B. glabrata* em duas delas.
- Existe uma baixa variabilidade genética intrapopulacional e uma alta variabilidade genética interpopulacional nas populações de *B. tenagophila* estudadas.
- O distrito de Ravena é uma área que necessita de vigilância epidemiológica, uma vez que houve um aumento da suscetibilidade das populações de *B. tenagophila* desta região, em comparação com estudos anteriores.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Hamid AHZ, Molfetta JB, Fernandez V & Rodrigues V 1999. Genetic variation between susceptible and non-susceptible snails to *Schistosoma* infection using random amplified polymorphic DNA analysis (RAPDs). *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* 41(5): 291-295.
- Andrade RM 1965. Ecologia de “*Australorbis glabratus*” em Belo Horizonte, Brasil. V: Infecção natural por “*Cercaria macrogranulosa*” Ruiz, 1952. *Rev. Brasil. Biol.* 25(3):305-314.
- Araújo MS & Santos SMC 1982. *Biomphalaria straminea* (Dunker 1848), encontrada em aquários de peixes ornamentais no Vale do Paraíba, município de Taubaté, suscetível à amostra de *Schistosoma mansoni* regional. Anais do VII Congresso Brasileiro de Parasitologia, Porto Alegre,RS 65p.
- Barbosa FS & Olivier L 1958. Studies on the snail vectors of bilharziasis mansoni in North-eastern Brazil. 18(5-6):895-908.
- Barbosa FS 1973. Possible competitive displacement and evidence of hybridization between two Brazilian species of planorbid snails. *Malacologia* 14: 401-408.
- Barbosa L, Caldeira R L, Carvalho OS, Vidigal THDA, Jannotti-Passos LK & Coelho PMZ 2006. Resistance to *Schistosoma mansoni* by transplantation of APO *Biomphalaria tenagophila*. *Parasite Immunology*, 28 209–212.
- Calado DC & Navarro-Silva MA 2006. Polimorphisms in Anopheles (*Kerteszia*) cruzii Dyar & Knab (Diptera, Culicidae) detected by PCR-RAPD. Genetic variability in individuals from same progeny. *Revista Brasileira de Zoologia* 22 (4): 1121-1126.
- Caldeira RL, Vidigal THDA, Matinella L, Simpson AJG, Carvalho OS 2000. Identification of planorbids from Venezuela by polymerase chain reaction amplification and restriction fragment length polymorphism of internal transcriber spacer of the RNA ribosomal gene. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95:171-177.
- Caldeira RL, Vidigal HDA, Simpson AJG & Carvalho SO 2001. Genetic variability in brazilian populations of *Biomphalaria straminea* complex detected by simple sequence repeat anchored polymerase chain reaction amplification. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 96(4): 535-544.

- Caldeira RL, Carvalho OS, Mendonça CLFG, Graeff-Teixeira C, Silva MCF, Ben R, Maurer R, Lima WS, Lenzi HL 2003. Molecular differentiation of *Angiostrongylus costaricensis*, *A. cantonensis*, and *A. vasorum* by Polymerase Chain Reaction and Restriction Fragment Length Polymorphism. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 1039-1043.
- Caldeira RL, Jannotti-Passos LK, Lira PM & Carvalho OS 2004. Diagnostic of *Biomphalaria* Snails and *Schistosoma mansoni*: DNA obtained from traces of shell organic materials. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 99(5): 499-502.
- Camargo S 1980. Impacto do desenvolvimento na expansão da esquistossomose. *Rev. Inst Med Trop São Paulo* 22: 117-119.
- Campos YR, Carvalho OS, Goveia CO & Romanha AJ 2002. Genetic variability of the main intermediate host of the *Schistosoma mansoni* in Brazil, *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda: Planorbidae) assessed by SSR-PCR. *Acta Tropica* 83:19-27.
- Calienes AF, Fraga J, Pointier JP, Yong M, Sanchez J, Coustau C, Gutierrez A, Theron A 2004. Detection and genetic distance of resistant populations of *Pseudosuccinea columella* (Mollusca: Lymnaeidae) to *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea) using RAPD markers. *Acta Tropica* 92: 83-7.
- Cardoso PCM, Caldeira RL, Lovato MB, Coelho PMZ, Berne MEA, Muller G & Carvalho OS 2006. Genetic variability of Brazilian populations of *Lymnaea columella* (Gastropoda: Lymnaeidae), an intermediate host of *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea). *Acta Tropica* 97:339-345.
- Carvalho OS, Milward de Andrade R & Cortês MIN 1975. Roedores silvestres na epidemiologia da esquistossomose mansônica no Lago da Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais (Brasil). *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 27-35.
- Carvalho OS, Milward de Andrade R & Souza CP 1979. Suscetibilidade de *Biomphalaria tenagophila* (d'Orbigni, 1835), de Itajubá (MG) à infecção pela cepa "LE" de *Schistosoma mansoni* Sambon, 107, de Belo Horizonte, MG (Brasil). *Ver. Saúde Públ.* São Paulo 13: 20-25.

- Carvalho OS & Souza CP 1980. Suscetibilidade de *Biomphalaria tenagophila* (d'Orbigni, 1835) originária de Ravena, Município de Sabará , MG (Brasil) à cepa "LE" de *Schistosoma mansoni*. *Anais V Congresso Brasil. Parasit.* Rio de Janeiro, RJ.
- Carvalho OS & Guimarães CT 1984. Distribuição atual dos planorbídeos hospedeiros intermediários de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, no Lago da Pampulha, Belo Horizonte, MG (Brasil). *Anais XX Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical e I Congresso da Sociedade Latino-Americana de Medicina Tropical.* p. 81.
- Carvalho OS, Guimarães CT, Massara CL & Bonésio JER 1985. Situação atual da esquistossomose mansoni no Lago da Pampulha, Belo Horizonte, MG, Brasil. *Rev. Saúde Públ. São Paulo* 19:270-277.
- Carvalho OS, Massara CL, Rocha RS & Katz N 1988b. Esquistossomose mansoni no Sudoeste do Estado de Minas Gerais. *Rev. Saúde públ. S. Paulo* 22: 237-239.
- Carvalho OS, Rocha RS, Massara CL & Katz N 1988a. Primeiros casos autóctones de esquistossomose mansoni em região do Noroeste do Estado de Minas Gerais. *Rev. Saúde Públ. S. Paulo* 22(3): 237-239.
- Carvalho OS, Caldeira RL, Simpson AJG & Vidigal THDA 2001. Genetic variability and molecular identification of Brazilian *Biomphalaria* species (Mollusca: Planorbidae). *Parasitology.* 123
- Coelho PMZ 1995. Resistência e suscetibilidade à infecção por *Schistosoma mansoni* em caramujos do gênero *Biomphalaria* . In: Barbosa FS. Tópicos em Malacologia Médica, Ed. Fiocruz p 208-217.
- Coelho PMZ, Carvalho OS, Andrade ZA, Martins-Souza RL, Rosa FM, Barbosa L, Pereira CAJ, Caldeira RL, Jannotti-Passos LK, Godard ALB, Moreira LA, Oliveira GC, Franco GR, Teles HMS, Negrão-Corrêa D 2004. *Biomphalaria tenagophila/Schistosoma mansoni* Interaction: Premises for a new approach to biological control of schistosomiasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 99(Suppl I): 109-111.

- Corrêa LL, Corrêa MOA, Vaz JF, Silv MIPG, Silva RM & Yamanaka MT 1980. Importância das plantas ornamentais dos aquários como veículos de propagação dos vetores do *Schistosoma mansoni*. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 40: 89-96.
- Corrêa LR & Paraense WL 1971. Susceptibility of *Biomphalaria amazonica* to infection with two strains of *Schistosoma mansoni*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 13: 387-390.
- Corrêa RR, Murgel JMT, Piza JT, Ramos AS, Dias LCS, Moraes LV & Rosário FF 1970. Dispersão de *Biomphalaria straminea*, hospedeira intermediária do *Schistosoma mansoni* através da distribuição de peixes. *Rev. Saúde São Paulo* 4: 117-127.
- Corrêa MCR, Coelho PMZ & Freitas JR 1979. Suscetibilidade de linhagens de *Biomphalaria glabrata tenagophila* e *Biomphalaria glabrata* a duas cepas de *Schistosoma mansoni* (LE – Belo Horizonte e SJ – São José dos Campos). *Rev. Inst. Med Trop. São Paulo* 21: 72:76.
- Coura JR & Amaral RS 2004. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in braziln endemic áreas. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 99(Suppl I): 13-19
- Coura-Filho P 1994. Uso do paradigma de risco para a esquistossomose em áreas endêmicas no Brasil. *Cad Saúde Públ*, 10(4): 464-472.
- Coura-Filho P, Farah MWC, Resende DF, Lamartine SS, Carvalho OS & Katz N 1995. Determinantes ambientais e sociais da esquistossomose mansoni em Ravena, Minas Gerais, Brasil. *Cad Saúde Públ*, 11(2): 254-265.
- Coura-Filho P, Rocha RS, Lamartine SS, Farah MWC, Resende DF, Costa JO & Katz N 1996. control of schistosomiasis mansoni in Revena (Sabará, state of Minas Geraes, Brasil) through water supply and quadrennial treatments. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 91 (6): 659-664.
- Cofcewicz ET, Carneiro RMDG, Castagnone-Sereno P & Queneherve P 2004. Enzyme phenotypes and genetic diversity of root-knot nematodes parasitising Musa in Brazil. *Nematology*, 6: 85-95.
- Deslandes N 1951. Técnica de dissecação e exame de planorbídeos. *Rev Serv Espec Saúde Públ* 4: 371-382.

- Engels D, Chitsulo L, Montresor A & Savioli L 2002. The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. *Acta Trop*, 82: 139-146.
- Espindola KS, Machado MM & Hofmann PRP 1992. Natural and experimental-infection of planorbids from the island of Santa-Catarina (Brazil) *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. 34 (4): 289-294.
- Felsenstein J 1985. Confidence limits on phylogenies: na approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783-391.
- Ferreira ME & Grattapaglia D 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3 ed. Embrapa, Brasília, DF.
- Ferreira AD, Vitor RWA, Gazzinelli RT, Melo MN 2006. Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR-RFLP. *Infection Genetics and Evolution* 6 (1): 22-31.
- Futuyma DJ 1997. *Evolutionary Biology* 3 ed. Sinauer Associates Inc., Sunderland, 631p
- Guimarães CT 1978. Observações bio-ecológicas sobre *Pomacea haustum* (Reeve, 1856): sua utilização no controle biológico da esquistossomose mansoni. Dissertação de mestrado, Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, Belo Horizonte.
- Guimarães CT, Souza CP, Soares DM, Araújo N & Schuster LMR 1990. Occurrence of molluscs in aquaria of ornamental fishes in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 85:127-129.
- Gutierrez A, Pointier JP, Fraga J, Jobet E, Sylvain M, Perez RT, Yong M, Sanchez J, Loker ES, Théron A 2003. *Fasciola hepatica*: identification of molecular markers for resistant and susceptible *Pseudosuccinea columella* snail host. *Exp Parasitol* 105: 211-218.
- Graeff-Teixeira C, Anjos CB, Oliveira VC, Velloso CFP, Fonseca MBS, Valar C, Moraes C, Garrido CT, Amaral RS 1999. Identification of a transmission focus of *Schistosoma mansoni* in the southernmost brazilian state, Rio Grande do Sul. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 9-10.

- Hills DM & Bull JJ 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Sist. Biol.* 42: 182-192.
- Jannotti-Passos LK, 1998. Uso do DNA mitocondrial de *Schistosoma mansoni* em estudos de herança genética e diagnóstico de infecção em *Biomphalaria glabrata*. Tese de Mestrado. Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.
- Kane RA & Rollinson D 1994. Repetitive sequences in the ribosomal DNA internal transcribed spacer of *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma intercalatum* and *Schistosoma mattheii*. *Mol Bioch Parasit*, 63: 153-156.
- Katz N 1986. Controle da Esquistossomose no estado de Minas Gerais. In: Modernos conhecimentos sobre esquistossomos mansônica. 14: 51-66.
- Katz N, Mota E, Oliveira VB & Carvalho EF 1978. Prevalência da esquistossomose em escolares no estado de Minas Gerais. Resumo XIV Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.
- Katz N & Carvalho OS 1983. Introdução recente da esquistossomose mansoni no Sul do Estado de Minas Gerais, Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 78: 281-4.
- Katz N & Peixoto SV 2000. Análise crítica da estimativa do número de portadores da esquistossomose mansoni no Brasil. *Rev Soc Bras Med Top*, 33 (3): 303-308.
- Kawazoe U, Magalhães LA, Hotta LK & Takaku L 1980. Competição biológica entre *Biomphalaria glabrata* (Say, 1918) e *Biomphalaria tenagophila* (D'Orbigny, 1835), em criadouros naturais no município de Ourinhos, SP (Brasil). *Rev. Saúde Públ. São Paulo* 14:65-87.
- Lambertucci JR, Rocha R.S, Carvalho OS & Katz N 1987. A Esquistossomose mansoni em Minas Gerais. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 20: 47-52.
- Lax P, Duenas JCR, Gardenal CN & Doucet ME 2004. Genetic variability estimated with RAPD-PCR markers in two populations of *Heterodera glycines* Ichinohe, 1952 (Nematoda: Heteroderidae) from Argentina. *Nematology*, 6: 13-21.

- Lewis FA, Richards CS, Knight M, Cooper LA & Clark B 1993. *Schistosoma mansoni*: Analysis of an unusual infection phenotype in the intermediate host snail *Biomphalaria glabrata*. *Exp. Parasit.* 77: 349-361.
- Lewis FA, Patterson CN & Grzywac C 2003. Parasite-susceptibility phenotypes of F₁ *Biomphalaria glabrata* progeny derived from interbreeding *Schistosoma mansoni*-resistant and -susceptible snails. *Parasitol. Res.* 89:98-101.
- Malek EA & Rouquayrol MZ 1986. Experimental infection with *Schistosoma mansoni* of *Biomphalaria straminea* from different parts of the Northeast of Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 28(3):160-165.
- Madsen H & Frandsen F 1989. The spread of freshwater snails including those of medical and veterinary importance. *Acta. Trop.* 46:139-146.
- Magalhães LA 1970. Estudo do comportamento de cepa de *S. mansoni* de Brasília. *O Hospital* 11: 273-282.
- Martins-Souza RL, Coelho PMZ, Andrade ZA, Negrão-Corrêa D 2003. Sílica treatment increases *Biomphalaria tenagophila* susceptibility to *Schistosoma mansoni*. *Parasitol. Res.* 91: 500-550.
- Margonari CS, Fortes-Dias CL & Dias ES 2004. Genetic variability in geographical populations of *Lutzomyia whitmani* elucidated by RAPD-PCR. *Journal of Medical Entomology*, 41 (2): 187-192.
- Michelson EH & Dubois L 1979. Competitive interaction between two snail hosts of *Schistosoma mansoni*: laboratory studies on *Biomphalaria glabrata* and *B. straminea*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 21(5): 246-253.
- Milward-de-Andrade R 1965. Ecologia do *Australorbis glabratus* (Pulmonata, Planorbidae) em Belo Horizonte, Brasil. IV – Infecções simples e mistas dos caramujos por trematódeos. *Separata da Revista Brasileira de Malariologia e Doença Tropicais* N°4 volume XVIII.

- Milward-de-Andrade R & Carvalho OS 1978. Fauna planorbídica da Bacia hidrográfica do Lago da Pampulha, MG (Brasil) (Pulmonata, planorbidae). Anais de resumo XIV Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical p.89.
- Moritz C & Hillis DM 1996. Molecular systematics: Context and controversis, p. 1-16. In: Hillis DM, Moritz C, Mable BK. *Molecular Sytematics* 2nd ed., Sinauer Associates Sunderland, Masachusetts, 655p.
- Nei M & Li WH 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 76: 5269-5273.
- Otranto D, Tarsitano E, Traversa D, Giangaspero A, De Luca F, Puccini V 2001. Differentiation among three species of bovine *Thelazia* (Nematoda: Thelaziidae) by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of the first internal transcribed spacer ITS-1 (rDNA). *Inter J Parasitol* 31:1693-1698.
- Paraense WL 1955. Autofecundação e fecundação cruzada em *Australorbis glabratus*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 53: 277-284
- Paraense WL 1966. The synonymy and distribution of *Biomphalaria peregrina* in the Neotropical region. *Rev Bras Biol* 26: 269-298.
- Paraense WL 1970. Planorbídeos hospedeiros intermediários do *S. mansoni*. In: Cunha AS. Esquistossomose mansoni. São Paulo, Editora da Universidade de São Paulo p. 13-30.
- Paraense WL 1972. Fauna planorbídica do Brasil. In: introdução à geografia médica do Brasil (ed. Lacaz CS, Baruzzi RG & Siqueira Junior W): 213-239. São Paulo, Edgard Blücher, Editora Universidade de São Paulo.
- Paraense WL 1975. Estado atual da sistemática dos planorbídeos brasileiros. *Arq. Mus. Nac.* Rio de Janeiro 55:105-128.
- Paraense WL 1981. *Biomphalaria occidentalis* sp.n. from south America (Mollusca, Basomatophora, Pulmonata). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 76(2): 99-211.

- Paraense WL 1984. *Biomphalaria tenagophila guaibensis* SSP.N. From southern Brazil and Uruguay (Pulmonata: Planorbidae). I Morphology. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 79: 465-469.
- Paraense WL 1986. Distribuição dos caramujos no Brasil: modernos conhecimentos sobre a esquistossomose mansônica. *Bib Acad Min de Medic* p.117-128.
- Paraense WL 1988. *Biomphalaria kuhniana* (Clessin 1883), planorbid mollusc from South America. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 83: 1-12.
- Paraense WL 2001. The Schistosome vectors in the Americas. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 96: 7-16.
- Paraense WL 2003. Taxonomia morfológica e taxonomia molecular. Anais de resumos do XII Encontro Brasileiro de Malacologia, Rio de Janeiro, Brasil p.52.
- Paraense WL & Corrêa LR 1963. Variation in susceptibility of populations of *Australorbis glabratus* to a strain of *Schistosoma mansoni*. *Rev. Inst. Med Trop. São Paulo* 5: 15-22.
- Paraense WL & Corrêa LR 1973. Susceptibility of *Biomphalaria pergrina* from Brazil and Ecuador to two strains of *Schistosoma mansoni*. *Rev Ins Med Trop São Paulo* 15: 127-130.
- Paraense WL & Corrêa LR 1978. Differential suscetibility of *Biomphalaria tenagophila* populations to infection with a strain of *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.* 64(5): 822-826.
- Paraense WL & Corrêa LR 1987. Probable extension of schitosomiasis mansoni to southernmost Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 82(4): 577.
- Paraense WL & Corrêa LR 1989. A potential vector of *Schistosoma mansoni* in Uruguai. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 84(3): 281: 288.
- Paraense WL & Deslandes N 1955. Observations on the morphology of *Australorbis glabratus*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 53(1): 87-103.
- Paraense WL, Pereira O, Pinto DB 1955. Um aspecto da ecologia do “*Australorbis glabratus*” que favorece a reinfestação dos criadouros. *Rev Serv Esp Saúde Pub* 7:573-581.

- Passos ADC & Amaral RS 1998. Esquistossomose mansônica: aspectos epidemiológicos e de controle. *Rev Soc Bras Med Top*, 31(Suplemento II): 61-74.
- Pellegrino J & Katz N 1968. Experimental chemotherapy of Schistosomiasis mansoni. *Adv Parasitol*, 6:233-90.
- Pellon AB & Teixeira I 1950. Distribuição geográfica da esquistossomose mansônica no Brasil. Ministério da Educação e Saúde, Departamento Nacional de Saúde, Divisão de Organização Sanitária. In: Oitavo Congresso Brasileiro de Higiene. Rio de Janeiro.
- Pinotti M, Rey L, Aragão MB & Cunha AG 1980. Epidemiologia da esquistossomose e variação periódica das populações malacológicas, em Pernambuco, Brasil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 2:183-188.
- Pires ER, Vidigal THDA, Teles HMS, Simpson AJG & Carvalho OS 1997. Specific identification of *Biomphalaria tenagophila* and *Biomphalaria occidentalis* populations by the low stringency polymerase chain reaction. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 92 (1): 101-106.
- Raahauge OP & Kristensen TK 2000. A comparison of *Bulinus africanus* group species (Planorbidae; Gastropoda) by use of the internal transcribed spacer 1 region combined by morphological and anatomical characters. *Acta Tropica* 75:85-94.
- Richards CS 1970. Genetics of a Molluscan Vector of Schistosomiasis. *Nature* 227: 806-810.
- Richards CS 1984. Influence of snail age on genetic variations in susceptibility of *Biomphalaria glabrata* for infection with *Schistosoma mansoni*. *Malacologia* 25(2): 493-502.
- Richards CS & Shade PC 1987. The genetic variation of compatibility in *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni*. *J Parasitol* 73: 1146-1151.
- Rosa FM, Caldeira RL, Carvalho OS, Godard ALB & Coelho PMZ 2004. Dominant character of the molecular marker of a *Biomphalaria tenagophila* strain (Mollusca: Planorbidae) resistant to *Schistosoma mansoni*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 99(1): 85-87.

- Rosa FM, Godard ALB, Azevedo V & Coelho PMZ 2005. *Biomphalaria tenagophila*: dominant character to the resistance to *Schistosoma mansoni* in descendents of crossbreedings between resistant (Taim, RS) and susceptible (Joinville, SC) strains. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 100(1): 19-23.
- Rotureau B, Ravel C, Couppie P, Pratlong F, Nacher M, Dedet JP & Carme B 2006. Use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis to identify the main new world *Leishmania* species and analyze their taxonomic properties and polymorphism by application of the assay to clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology* 44 (2): 459-467.
- Ruiz JM 1952. Contribuição ao estudo das formas larvárias de trematóides brasileiros. 3 – Fauna de Belo Horizonte e Jaboticatubas, Estado de Minas Gerais. *Mem. Inst. Butantan*. 24(1): 45-62.
- Ruiz JM 1953. Contribuição ao estudo das formas larvárias de trematóides brasileiros. 5 – Descrição de três furocercárias que ocorrem em planorbídeos hospedeiros do *Schistosoma mansoni*. *Mem. Inst. Butantan*. 25(2): 77-89.
- Ruiz JM 1957. Esquistosomose experimental. 5. Dados sôbre a infestação experimental de “*Biomphalaria tenagophila*” (Orbigny) e “*Australorbis glabratus*” (Say). *Rev. Brasil Biol* 17(2): 179-185.
- Saiki RK, Scharf S, Falooma F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim M 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle-cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
- Saitou N & Nei M 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-426.
- Santos FR, Pena SDJ, Epplen TJ 1993. Genetic population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism. *Hum Genet* 90: 655-656.
- Santos MBL, Freitas JR, Correia MCR & Coelho PMZ 1979. Suscetibilidade ao *Schistosoma mansoni* de híbridos de *Biomphalaria tenagophila* do Taim, RS, Cabo Frio, RJ, e Belo Horizonte, MG. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 21(6): 281-286.]

- Simpson AJ, Dias Neto E, Vidigal THDA, Pena HB, Carvalho OS & Pena SDJ 1995. DNA polymorphism of schistosomes and their snail hosts. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 90: 211-213.
- Souza CP & Lima LC 1997. Moluscos de interesse parasitológico do Brasil. Série de esquistossomose n° I. 2 ed.
- Souza CP, Araújo N, Madeira NG & Carvalho OS 1983. Suscetibilidade de *Biomphalaria tenagophila* de Belo Horizonte e adjacências à infecção com três cepas de *Schistosoma mansoni*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 25(4): 168-172.
- Souza CP, Araújo N, Carvalho OS & Freitas JR 1987. Potencialidade de *Biomphalaria tenagophila* do lago da Pampulha, Belo Horizonte, MG, como hospedeira do *Schistosoma mansoni*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 82(1): 67-70.
- Souza CP, Jannotti-Passos LK & Freitas JR 1995. Degree of host-parasite compatibility between *Schistosoma mansoni* and their intermediate molluscan hosts in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* Rio de Janeiro 90(1): 5-10 jan/feb.
- Souza CP, Lima LC, Jannotti-Passos LK, Ferreira SS, Guimarães CT, Vieira IBF & Junior RM 1998. Moluscos límnicos da microrregião de Belo Horizonte, MG, com ênfase nos vetores de parasitoses. *Rev Soc. Bras. Med Trop* 31(5):449-456.
- Spada RGM, da Silva D, Abdel-Hamid A-Z, Sobral-Hamguchi SS, Zuim NRB, Zanotti-Magalhães EM, Magalhães LA & Ribeiro-Paes JT 2002. Genetic markers between *Biomphalaria glabrata* snails susceptible and resistant to *Schistosoma mansoni*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97(Suppl. I): 53-58.
- Spatz L, Vidigal THDA, Caldeira RL, Neto ED, Cappa SMG, Carvalho OS 1998. Molecular study of similar *Biomphalaria* species. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 93: 169-170 Suppl. 1.
- Spatz L, Vidigal THDA, Caldeira RL, Neto ED, Cappa SMG, Carvalho OS 1999. Study of *Biomphalaria tenagophila tenagophila*, *B. t. guuibensis* and *B. occidentalis* by polymerase chain reaction amplification and restriction enzyme digestion of the ribosomal RNA intergenic spacer regions. *Journal of Molluscan Studies* 65: 143-149.

- Teles HMS 2005. Distribuição geográfica das espécies dos caramujos transmissores de *Schistosoma mansoni* no Estado de São Paulo. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 38(5):426-432.
- Van de Peer Y & De Wachter R 1994. TRECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput Applic Biosci* 10: 569-570.
- Velasquez LE, Caldeira RL, Estrada V & Carvalho OS 2002. Morphological and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism characterization of *Biomphalaria kuhniana* and *Biomphalaria amazonica* from Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 97(7):997-1004.
- Vidigal THDA, Dias NE & Carvalho OS 1994. *Biomphalaria glabrata*: extensive genetic variation in Brazilian isolates revealed by random amplified polymorphic DNA analysis. *Experimental Parasitology* 79: 187-194.
- Vidigal THDA, Spatz L., Nunes DN, Simpson AJG, Carvalho OS & Dias Neto E 1998. *Biomphalaria* spp: identification of the intermediate snail hosts of *Schistosoma mansoni* by polymerase chain reaction amplification and restriction enzyme digestion of the ribosomal RNA gene intergenic spacer. *Experimental Parasitology* 89: 180-187.
- Vidigal THDA, Kissinger JC, Caldeira RL, Pires ECR, Monteiro E, Simpson AJG & Carvalho OS 2000. Phylogenetic relationships among Brazilian *Biomphalaria* species (Mollusca: Planorbidae) based upon analysis of ribosomal ITS2 sequences. *Parasitology* 121, 611-620.
- Vidigal THDA, Magalhães KG & Carvalho 2004. Polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis of the ITS2 region for differentiation of Brazilian *Biomphalaria* intermediate hosts of the *Schistosoma mansoni*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 37(4): 351-353.
- Vidigal THDA, Spatz L, Kissinger J K, Redondo RAF, Pires ECR, Simpson AJ, Carvalho OS 2004a. Analysis of the first and second internal transcribed spacer sequences of the ribosomal DNA in *Biomphalaria tenagophila* complex (Mollusca:Planorbidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 153-158.

- Welsh J & McClelland M, 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18: 7213-7218.
- Williams JGK, Kubelick AR, Livak KJ, Rafalski JÁ & Tingey SV 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.
- World Health Organization (WHO) 1993. The control of schistosomiasis. *WHO Technical Report Series*, N° 830.
- Zuim NRB, Zanotti-Magalhaes EM, Magalhães LA & Linhares AX 2005. Genetic selection of *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria tenagophila* seeking the alteration of the susceptibility and resistance to the *Schistosoma mansoni*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 38 (5): 387-390.