

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Monitoramento da inserção do patrimônio genético de *Biomphalaria tenagophila* do Taim (RS), linhagem resistente ao *Schistosoma mansoni*, após a sua introdução em uma área endêmica para esquistossomose no Município de Bananal/SP, com transmissão mantida por *B. tenagophila*.

por

Daisymara Priscila de Almeida Marques

Belo Horizonte

Abril/2012

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Monitoramento da inserção do patrimônio genético de *Biomphalaria tenagophila* do Taim (RS), linhagem resistente ao *Schistosoma mansoni*, após a sua introdução em uma área endêmica para esquistossomose no Município de Bananal/SP, com transmissão mantida por *B. tenagophila*.

por

Daisymara Priscila de Almeida Marques

**Dissertação apresentada com vistas à
obtenção do Título de Mestre em Ciências
na área de concentração Doenças
Infecciosas e Parasitárias**

Orientação: Paulo Marcos Zech Coelho

**Coorientação: Florence Mara Rosa
Déborah A. Negrão-Corrêa**

**Belo Horizonte
Abril/2012**

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

M298m Marques, Daisymara Priscila de Almeida.
2012

Monitoramento da inserção do patrimônio genético de *Biomphalaria tenagophila* do Taim (RS), linhagem resistente ao *Schistosoma mansoni*, após a sua introdução em uma área endêmica para esquistossomose no Município de Bananal/SP, com transmissão mantida por *B. tenagophila* / Daisymara Priscila de Almeida Marques. – Belo Horizonte, 2012.

XX, 99 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f.: 100 - 119

Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

1. Esquistossomose mansoni/prevenção & controle 2. *Schistosoma mansoni*/parasitologia 3. *Biomphalaria*/parasitologia I. Título. II. Coelho, Paulo Marcos Zech (Orientação). III. Rosa, Florence Mara (Coorientação). IV. Negrão-Corrêa, Deborah Aparecida (Coorientação).

CDD – 22. ed. – 616.963

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde**

Monitoramento da inserção do patrimônio genético de *Biomphalaria tenagophila* do Taim (RS), linhagem resistente ao *Schistosoma mansoni*, após a sua introdução em uma área endêmica para esquistossomose no Município de Bananal/SP, com transmissão mantida por *B. tenagophila*.

por

Daisymara Priscila de Almeida Marques

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Paulo Marcos Zech Coelho (Presidente)

Prof. Dra. Roberta Lima Caldeira

Prof. Dra. Silvana Aparecida Rogel Carvalho Thiengo

Suplente: Elio Hideo Babá

Dissertação defendida e aprovada em: 24 / 04 / 2012

Estou aprendendo a apreciar cada vez mais esse tal de tempo, pavor de alguns e aliado indiscutível de outros. O tempo fala, mostra, oferece, retira, instrui, aprimora, seleciona. Ele está sempre por perto, sutil, passando aqui e ali, modificando formas, cores, situações, pessoas. Trabalha silencioso, levando embora o ímpeto, o viço, “aquele” momento, a glória de outros tempos, mas deixa ao alcance dos que se dispuserem a buscar, o conforto da experiência, da sabedoria, da cautela, do auto-conhecimento. Pacientemente ele tenta nos mostrar que os momentos são únicos, que a vida é passagem, que nada nos pertence. Por vezes, duramente, ele nos retira coisas valiosas para nos fazer simplesmente enxergá-las. Impõe limites, forçando-nos a viver no presente. Noutras, generosamente, nos compensa com oportunidades inúmeras de superação, crescimento e reciclagem, dando-nos espaço e condições para reavaliar (pré) conceitos e valores, de alterar rotas, fazer novas escolhas e até de compensar a leviana juventude. Para os que percebem (e aceitam) a impermanência, surge o desafio, a mudança, novos (e talvez maravilhosos) momentos e finalmente o aprimoramento, a renovação. Um tempo de se vestir de si mesmo. De se ver singular. Um tempo em que o instante vivido basta. Para aqueles que rejeitam a passagem resta à estagnação, o desconforto de um corpo que muda, de uma cortina que se fecha, de uma história que virou antiga (**Silvia W Bernardi**).

Dedicatórias

Dedico esta dissertação a todos que contribuíram na minha trajetória acadêmica, aos amigos que me incentivaram e compreenderam os momentos de ausência, principalmente ao meu marido Ubirajara Junior, meu cúmplice, que me acompanha já há alguns anos compartilhando momentos de alegria e dificuldades. Sua confiança, tranquilidade, paciência e otimismo acalmam o meu coração. Agradeço ainda aos meus pais pela oportunidade de vir ao mundo e conquistar meu espaço com muito respeito. Obrigada pelo carinho e orações.

Agradecimentos

Antes de iniciar meus agradecimentos quero esclarecer que esta Dissertação é o resultado de uma jornada que não se iniciou no CPqRR. Assim, para não cometer injustiças, agradeço antecipadamente a todos que passaram pela minha vida e contribuíram direta ou indiretamente para meu crescimento pessoal, acadêmico e profissional.

Ao Dr. Paulo Marcos, meu orientador, por ter me aceitado como aluna de mestrado, pela confiança e total apoio dados para desenvolver esta pesquisa. Agradeço principalmente pela paciência e acima de tudo pelas contribuições para o meu crescimento científico e intelectual.

A Prof. Dra. Florence Mara Rosa, minha co-orientadora e amiga, meu primeiro contato com este projeto. Conselheira desde o início, sempre me incentivou a entrar para o Mestrado, pacientemente acompanhou de perto todo o processo e compartilhou comigo sua vasta experiência de laboratório, de campo e de vida.

A Prof. Dra. Déborah Negrão-Corrêa pela colaboração e antes de tudo por ter aceitado o meu retorno ao GIDE como estagiária e permanecido lá por inesquecíveis e proveitosos três anos e meio, onde aprendi muito, conheci e convivi com pessoas maravilhosas e experientes, como o Sr. Alberto, Zé Carlos, Zenir, Selma, Airton e Jefferson.

Ao Centro de Pesquisas René Rachou e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde pela oportunidade e suporte fornecido para realização deste trabalho.

As agências de fomento (FIOCRUZ, FUNDEP, CNPq) pelo suporte financeiro e a CAPES pela concessão de uma bolsa de estudos.

A banca examinadora por ter aceitado o convite para participar desta defesa e contribuir com sua experiência no trabalho.

À Biblioteca do CPqRR em promover acesso gratuito e remoto à informação técnico-científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrante do rol de referências desta dissertação, também pela catalogação e normatização da mesma.

Aos colaboradores e proprietários da Chácara Santa Inês, Dr. Engels Maciel e sua esposa Dra. Maria Lúcia (Minuca) pela contribuição ao projeto e pela atenção e carinho.

Ao Técnico da SUCEN de Bananal, responsável pela manutenção da criação em larga escala da linhagem *B. tenagophila* do Taim e companheiro de campo João Batista dos Santos, por compartilhar comigo sua grande experiência no projeto, pelos conselhos e amizade. Agradeço pelos momentos agradáveis de trabalho e engraçados também.

A Ana Lúcia que sempre abriu as portas da sua casa e aguentou firme nossos macacões cheios de lama pela casa e cubas repletas de preciosos caramujos, protegidos na varanda da sua casa. Além dos curtos, mas valiosos momentos de descontração.

Ao Áureo Almeida de Oliveira, dedico meus resultados de campo, pois sem sua contribuição e experiência eu não teria realizado tantas coletas. Sua preocupação e cuidado com a organização dos trabalhos de campo, companhia e histórias de viagem foram muito importantes.

Ao colaborador Dr. Horácio Manuel Santana Teles pesquisador da Superintendência de Controle de Endemias do Estado de São Paulo, pela parceria referente aos trabalhos de campo.

A Dra. Roberta Caldeira pelos ensinamentos e conselhos fornecidos durante todo o trabalho, principalmente nos momentos de aperto sendo sempre muito acessível, paciente, calma e prestativa.

A Dra. Lianna K.J. Passos, chefe do Moluscário Dr. Lobato Paraense, que me concedeu o espaço e as condições necessárias para condução dos exaustivos testes de suscetibilidade.

A minha amiga Selma, funcionária dedicada do moluscário no ICB que me apoiou e aconselhou em momentos de crise, que me ensinou a cuidar, organizar e manter as cubas repletas de desovas de caramujos no laboratório.

As meninas do moluscário Delza, Dilcia, Lidiane pelo auxílio na realização dos testes de suscetibilidade. Em especial, agradeço à Suelene, que me conquistou desde o primeiro dia, primeiro como pessoa e depois pela experiência, conselhos e ajuda.

Ao Laboratório de Referência em Helminologia e Malacologia Médica pelos relatórios técnicos de identificação Morfológica e Molecular de exemplares de *Biomphalaria* coletados no campo, em especial à Tatiana Teodoro pelos empréstimos e trocas de materiais, pelas dicas técnicas no processamento de amostras e para dinamização de diferentes protocolos experimentais.

Ao Sr. Jorge Gonçalves Coelho, funcionário da CTH (serviço de hidrografia) do Departamento de águas e Energia Elétrica de Bananal/SP pelo fornecimento dos dados pluviométricos.

Aos moradores e amigos do Município de Bananal que serão sempre carinhosamente lembrados.

A Vera de Paula, que conheci ainda no GIDE como secretária do Dr. Paulo e até hoje seu braço direito, auxiliando-nos brilhantemente na tradução de relevantes trabalhos científicos.

Às colegas que fiz no Laboratório de Esquistossomose do ICB/UFMG pela boa convivência. Ao Dr. Naftale Katz (Vice-chefe e Pesquisador Emérito do Laboratório de Esquistossomose/CPqRR) pelo legado científico e contribuições para a saúde.

A todos os colegas do LESQ (Laboratório de Esquistossomose do CPqRR) por me receberem e compartilharem suas experiências: Ana Carolina, Ana Karine, Aristeu, Babá, Cíntia, Clarice, Elisandra, Flávia, Isabela, Juliano, Kika, Liliane, Lucila, Ludimila, Marcela, Patrícia, Rafaela, Tatiane, Vanessa, Wander e Watson. Aos que permanecem muito sucesso sempre! Aos que partiram para outros projetos, minhas lembranças e desejos de boa sorte, aos novos integrantes (ICs e Diana) meu apoio. Em especial agradeço as minhas amigas: Gardênia, Vandinha, Jussara e Dra. Neusa Araújo, pela amizade, consideração e conselhos.

A Deus, pela proteção, presença e força para que eu persistisse diante as dificuldades e conquistasse mais uma vitória na minha vida.

Ao meu marido Ubirajara, pelo amor, carinho e dedicação, pela parceria na vida, por apoiar e arcar comigo as consequências das minhas escolhas e continuar ao meu lado nos meus momentos de fraqueza. Por compreender minha necessidade de provar o óbvio, de querer vencer os inúmeros desafios que a vida me apresentou até hoje, de mostrar que posso, sou capaz e por não me deixar esquecer principalmente da minha essência, valores, ponto de vista e tudo que almejo nesta vida.

Aos meus pais (Querubim e Fátima) pela oportunidade de vir ao mundo, e pela família maravilhosa que construímos.

Aos meus irmãos Dalton e Dayanne pelo aprendizado constante da convivência em família e momentos de descontração. Obrigada pela torcida! Aos meus cunhados por fazerem parte da família.

A minha amiga de infância, madrinha e afilhada Dra. Jordana G. A. C dos Reis pelo incentivo, conselhos e colaborações, mesmo com tão pouco tempo e a distância.

Aos amigos e cúmplices Marilda, Hudson e Liderci, que me adotaram como parte da família. Em especial à Marilda, que me despertou para a busca constante de conhecimento, principalmente acerca da Ciência, e da espiritualidade.

As grandes amigas que conquistei em diferentes momentos da minha vida: Jordana, Mislene, Elizangela, Sandra, Janaina, Rosale, Maria José, Solange pela companhia, incentivo, carinho, orações, conselhos, descontração e compreensão nos momentos de ausência.

A todos os docentes da minha trajetória acadêmica que fizeram a diferença desde a infância à Pós-Graduação.

A Elizabeth de Castro, uma amiga, que muito contribuiu para que eu estivesse todos os dias no René Rachou, e pudesse trabalhar com tranquilidade. Sem a sua ajuda tudo seria bem mais difícil.

Aos integrantes da família Ferreira da Silva pelos agradáveis e descontraídos almoços de domingo e ensinamentos.

A família Arcanjo Marques que cresce mais a cada dia e que direta ou indiretamente acompanhou minha rotina de trabalho. Aos sobrinhos e afilhados queridos por ter conseguido tirar de mim muitas gargalhadas. A minha sogra pelo apoio na reta final e tentativas de um convívio em família cada vez mais harmonioso e agradável.

Ao mar e à natureza que me relaxam, desintoxicam e recarregam minhas energias me deixando pronta para encarar novos desafios.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Esquistossomose do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ. A parte de campo foi realizada na chácara Santa Inês (com colaboração do proprietário e engenheiro químico Dr. Engels Maciel) e em coleções hídricas localizadas no Município de Bananal/SP (com colaboração da SUCEN de São Paulo na pessoa do Dr. Horácio Manuel Santana Teles).

Agradecimento às Agências Financiadoras

Agradeço à Instituição financiadora CAPES pela concessão de uma bolsa de estudos durante o curso, à SUCEN/SP, FIOCRUZ e CPqRR pela infraestrutura, suporte técnico e material disponibilizado.

Sumário

Lista de Figuras	XV
Lista de Tabelas	XVI
Lista de Gráficos.....	XVII
Lista de Abreviaturas.....	XVIII
RESUMO.....	XIX
ABSTRACT.....	XX
1 INTRODUÇÃO	XX
1.1 Esquistossomose: visão geral	21
1.2 Ciclo de transmissão.....	25
1.3 Hospedeiros Intermediários.....	27
1.3.1 Importância Epidemiológica do Gênero <i>Biomphalaria</i>	27
1.3.2 Aspectos morfológicos e bioecológicos do gênero <i>Biomphalaria</i>	30
1.4 Relação <i>Biomphalaria-Schistosoma mansoni</i>	33
1.5 Controle biológico da esquistossomose.....	36
2 JUSTIFICATIVA	41
3 OBJETIVOS	42
3.1 Objetivo Geral	42
3.2 Objetivos Específicos	42
4 MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1 Área de Estudo	43
4.2 Seleção de coleções hídricas para introdução.....	44
4.3 Exame Parasitológico	45
4.4 Identificação de moluscos	45
4.5 Obtenção de moluscos para os testes de infecção pelo <i>S. mansoni</i>	45
4.6 Ampliação da criação em larga escala de <i>B. tenagophila</i> do Taim.....	46
4.6.1 Local emontagem dos tanques.....	46
4.6.2 Criação e alimentação	47
4.7 Introdução da linhagem <i>B. tenagophila</i> do Taim/RS	49
4.8 Estimativa da população <i>B. tenagophila</i> após 15 dias da introdução.....	50
4.9 Monitoramento	51
4.9.1 Exame parasitológico.....	51
4.9.2 Análises moleculares	52

4.9.2.1 Extração e dosagem de DNA	52
4.9.2.2 Protocolo da PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism-Polimerase Chain Reaction).....	54
4.9.3 Testes de infecção	55
4.9.3.1 Parasito	55
4.9.3.2 Grupos experimentais dos testes de infecção	55
4.9.3.4 Protocolo de infecção	57
4.9.3.5 Taxa de infecção	57
4.10 Análise Estatística	59
5 RESULTADOS	60
5.1 Seleção de novas coleções hídricas para introdução	60
5.2 Identificação dos moluscos.....	60
5.3 Dados pluviométricos	61
5.4 Criação de <i>B. tenagophila</i> do Taim em larga escala	62
5.5 Estimativa da população <i>B. tenagophila</i> introduzida	62
5.6 Monitoramento	63
5.6.1 Análises moleculares	64
5.6.1.1 PCR_RFLP dos trematódeos	67
5.6.2 Testes de infecção.....	70
5.6.3 Detecção do marcador molecular da linhagem do Taim nos caramujos sobreviventes após a infecção por <i>S. mansoni</i>	72
6 DISCUSSÃO	77
7 CONCLUSÕES.....	81
8 ANEXO.....	82
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100

Lista de Figuras

Figura 1: Distribuição da esquistossomose de acordo com a faixa de prevalência, no Brasil	22
Figura 2: Ciclo de vida do <i>Schistosoma mansoni</i> ..	27
Figura 3: Principais acessos rodoviários de Bananal, São Paulo, Brasil e proximidade com municípios vizinhos.	43
Figura 4: Fotografias retiradas durante a realização do levantamento malacológico em córregos do município de Bananal/SP	44
Figura 5: Fotografias do novo espaço destinado para criação em larga escala de <i>B. tenagophila</i> do Taim localizada na chácara Santa Inês, Bananal/SP	48
Figura 6: Técnica de marcação física das conchas de <i>B. tenagophila</i> .	48
Figura 7: Introdução da linhagem <i>B. tenagophila</i> do Taim no córrego selecionado.	49
Figura 8: Fórmula utilizada para estimar a densidade populacional dos moluscos após a introdução no campo..	50
Figura 9: Técnica utilizada para seccionar partes de <i>B. tenagophila</i>	51
Figura 10: Esquema do gene codificador do RNA ribossomal	53
Figura 11: Metodologia utilizada nos testes de infecção	55
Figura 12: Fotografias do córrego Herivelton Martins, nova área escolhida para introdução da linhagem <i>B. tenagophila</i> do Taim demonstrando suas características físicas.	61
Figura 13: Géis de Poliacrilamida 6% corado pela prata demonstrando o perfil de restrição do fragmento de 1300pb, após digestão com a enzima de restrição DdeI dos exemplares de <i>B. tenagophila</i> coletados após 4, 11 e 14 meses da introdução.	66
Figura 14: Géis de Poliacrilamida 6% corado pela prata contendo o perfil da PCR_RFLP de alguns trematodeos e <i>B. tenagophila</i> infectados e não infectados	69
Figura 15: Gel de Poliacrilamida 6% corado pela prata demonstrando a PCR_RFLP dos sobreviventes da geração F1 submetidos ao 1º teste de infecção	74
Figura 16: Géis de Poliacrilamida 6% corado pela prata demonstrando a PCR_RFLP dos sobreviventes submetidos do 2º desafio.	75

Lista de Tabelas

Tabela 1: Grupos experimentais utilizados nos desafios com a cepa SJ de <i>S. mansoni</i>	56
Tabela 2: Estimativa da densidade populacional de <i>B. tenagophila</i> do Taim no córrego Herivelton Martins, 15 dias após a introdução.....	63
Tabela 3: Exemplares coletados após a introdução da linhagem do Taim, no córrego Herivelton Martins/Bananal-SP.....	63
Tabela 4: Resultados dos desafios realizados com descendentes F1 dos caramujos coletados antes, após 4, 11 e 14 meses da introdução de <i>B. tenagophila</i> do Taim, no córrego Herivelton Martins, em Bananal/SP.	71
Tabela 5: Resultados da PCR_RFLP dos caramujos sobreviventes submetidos ao 1º e 2º desafios por <i>S. mansoni</i>	76

Lista de Gráficos

Gráfico 1: Dados pluviométricos de Bananal/SP de Jan/2010 a Out/2011..... **62**

Gráfico 2: Percentual do marcador molecular de 350pb (típico da linhagem do Taim) nos caramujos coletados após a intervenção..... **67**

Gráfico 3: Resultado dos testes de infecção realizados com os descendentes F1 de caramujos coletados antes e após a introdução..... **72**

Gráfico 4: Comparação da ocorrência do marcador molecular de 350pb nos sobreviventes após a introdução..... **76**

Lista de Abreviaturas

APO	Amebocyte producing organ
cDNA	Complementary DNA
COI	Citocromo C Oxidase Subunidade I
ConA	Concanavalin agglutinin A – Lectina isolada de <i>Concavalia ensiformis</i>
CpqRR	Centro de Pesquisas René Rachou
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid/ ácido etilenediamino tetra-acético
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
Hab.	Habitantes
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia
ICB/UFMG	Instituto de Ciências Biológicas-Universidade Federal de Minas Gerais
ITS	Região espaçadora transcrita interna do gene do RNA ribossomal
KK	Kato-Katz
Low DNA Mass Ladder	Padrão de quantificação de DNA de baixo peso molecular
LHMM	Laboratório de Helmintologia e Malacologia Médica do CPqRR
MS	Ministério da Saúde
pb	Pares de bases
PCR	Polimerase Chain Reaction
PCR-RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism-Polimerase Chain Reaction
PNA	Peanut agglutinin – Lectina isolada de <i>Arachis hypogaea</i>
rDNA	DNA ribossomal
rDNA	DNA ribossomal
mtDNA	Ácido Desoxirribonucleico mitocondrial
SBA	Soybean agglutinin - Lectina isolada de <i>Glycine Max</i>
SUCEN	Superintendência de Controle de Endemias
TBE	Tampão Tris/Borato/EDTA
WGA	Wheat Germ Agglutinin – Lectina isolada de <i>Triticum vulgare</i>
WHO/OMS	World Health Organization/Organização Mundial de Saúde

RESUMO

O córrego Herivelton Martins foi escolhido para dar continuidade aos estudos com a introdução da linhagem *Biomphalaria tenagophila* do Taim/RS, resistente ao *Schistosoma mansoni*, em coleções hídricas do Município de Bananal/SP, iniciados em 2008. Oitocentos exemplares *B. tenagophila* adultos da linhagem Taim/RS foram marcados e introduzidos. Pelo método de marcação da concha foi estimada a densidade populacional da linhagem introduzida em relação à local. Após 15 dias da introdução 37,5% dos caramujos coletados estavam marcados. Após 4, 11 e 14 meses da introdução, caramujos jovens (≤ 5 mm de diâmetro) foram coletados e submetidos a técnica de PCR_RFLP para identificação do marcador molecular de 350pb, típico da linhagem do Taim e com caráter dominante. A proporção do marcador molecular nestes caramujos foi 37,1%, 35,7 e 60% respectivamente. Foram realizados três testes de infecção com a cepa SJ de *S. mansoni* com os descendentes F1 de caramujos coletados nos diferentes períodos após a introdução. Os sobreviventes foram submetidos à técnica de PCR_RFLP para verificar se havia alguma correlação entre a resistência e a presença do marcador de 350pb. No primeiro desafio com o *S. mansoni* 38,6% dos exemplares provenientes dos caramujos locais, coletados antes da introdução, estavam positivos, bem como 14,9% dos descendentes coletados após 4 meses da introdução. A análise molecular realizada com os caramujos positivos para *S. mansoni*, oriundos de exemplares pós-introdução, demonstraram que apenas 10% apresentaram o marcador de 350 pb, sendo que este marcador estava presente em 60,8% dos caramujos negativos. No segundo desafio, os descendentes de caramujos coletados antes, após 4 e 11 meses da introdução apresentaram taxas de infecção de 25%, 4,1%, 17%, respectivamente. Os caramujos positivos para *S. mansoni* não apresentaram o marcador molecular. A percentagem do marcador molecular nos caramujos negativos, coletados após 4 e 11 meses da introdução, foi de 66,6% e 56,2%, respectivamente. No terceiro desafio, as taxas de infecção dos descendentes foram de 26,5% antes da introdução, 6,8% após 11 meses e 2,1% após 14 meses. A análise molecular dos descendentes neste desafio está em andamento. Os dados apontam para uma significativa diminuição da suscetibilidade dos caramujos coletados após a intervenção. O marcador molecular de 350pb típico da linhagem do Taim foi detectado em proporções muito maiores nos caramujos negativos. Os resultados parciais obtidos permitem a inferência que o patrimônio genético da linhagem resistente *B. tenagophila* do Taim está sendo transmitido com êxito aos descendentes após intervenção tendo como consequência uma maior resistência à infecção por *S. mansoni*.

SUMMARY

The stream Herivelton Martins was chosen to continue the studies on introduction of *Biomphalaria tenagophila* from Taim/RS, resistant to *Schistosoma mansoni*, in hydric collections of Bananal/SP, initiated in 2008. Eight hundred adult specimens of *B. tenagophila* belonging to the lineage of Taim/RS were labeled and introduced. The populational density of the introduced lineage in relation to the local one was estimated using the labeling method of the shell. Fifteen days post-introduction, 37.5% of the collected snails were labeled. After 4, 11 and 14 months of the introduction, juvenile snails (≤ 5 mm diameter) were collected and submitted to PCR-RFLP technique for identification of the molecular marker 350 pb, typical of the Taim lineage and with dominant character. The proportions of the molecular marker in these snails were 37.1%, 35.7% and 60%, respectively. Three infection tests were carried out with the SJ strain of *S. mansoni*, using the descendants F_1 of the snails collected on different periods after introduction. The surviving snails were submitted to the PCR-RFLP technique, in order to verify if there was any correlation between resistance and the presence of the marker 350 pb. In the first challenge with *S. mansoni*, 38.6% of the specimens belonging to the local population, and collected before introduction, were found to be positive, as well as 14.9% of the offsprings collected 4 months post-introduction. The molecular analysis performed with positive snails to *S. mansoni*, related to specimens after introduction, demonstrated that only 10% presented the molecular marker 350 pb, and this marker was present in 60.8% of the negative snails. In the second challenge, the offsprings of the snails collected before or 4 and 11 months post-introduction presented infection rates of 25%, 4.1% and 17%, respectively. The positive snails for *S. mansoni* did not present the molecular marker. The proportions of the molecular marker in the negative snails, collected 4 and 11 months after introduction, were 66.6% and 56.2%, respectively. In the third challenge, the infection rates of the descendants were 26.5% before introduction, 6.8% after 11 months and 2.1% after 14 months. The molecular analysis of the descendants related to this challenge is in progress. Data point out to a significant decrease in the susceptibility of the snails collected after intervention. The molecular marker 350 pb, typical of the Taim lineage, was detected in higher proportions in the negative snails. The partial results obtained allow to infer that the genetic heritage of the resistant *B. tenagophila* strain from Taim is being successfully transmitted to the descendants after intervention, showing as a result a higher resistance to *S. mansoni* infection.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Esquistossomose: visão geral

A esquistossomose é uma doença parasitária que possui acentuados níveis de prevalência sendo considerada endêmica em vários países da África, Ásia e América Latina. Estimativas prévias realizadas indicaram uma perda anual de 1,7 a 4,5 milhões de anos de vida por incapacidade causada pela doença no mundo (WHO, 2002 e 2004). Entretanto, de acordo com um levantamento recente realizado por King (2010) estes dados encontram-se subestimados, assim podendo alcançar 25-28 milhões de Dalys (*Disability-adjusted life-year*). Trata-se de uma parasitose associada à pobreza e a inadequação das políticas econômicas, sanitárias e sociais. Estas e outras características somam-se aos aspectos da biologia e do ciclo de transmissão do parasito e permitem estimar 207 milhões de pessoas infectadas no mundo distribuídas em 76 países e territórios, além das 779 milhões de pessoas sob o risco de contrair esta infecção (Engels, *et al*, 2002; Steinmann *et al*, 2006). Acredita-se que 90% das pessoas com necessidade de tratamento para esquistossomose vivem na África (WHO, 2012). Diante deste cenário não é difícil compreender a razão da elevada morbidade e mortalidade mundiais causadas pela esquistossomose dentro das doenças parasitárias, valores que apenas são inferiores quando comparados com a malária (Brooker & Utzinger, 2007). Os agentes etiológicos desta enfermidade nos seres humanos são helmintos trematódeos digenéticos do gênero *Schistosoma* que completam seu ciclo evolutivo em Planorbídeos do gênero *Biomphalaria*. Das cinco principais espécies que parasitam o homem, *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 é responsável pela esquistossomose intestinal ou moléstia de Pirajá da Silva que está presentes em 54 países na África, Antilhas e América do Sul (Chitsulo *et al*, 2000). No Brasil a esquistossomose mansoni é a única que ocorre acometendo aproximadamente 7 milhões de pessoas e 25-30 milhões estão sob o risco de infecção (Katz & Peixoto, 2000). Segundo estes autores, os dados estão subestimados e evidenciam a importância da realização de um novo inquérito epidemiológico nacional que ora está em curso. A área endêmica é quase contínua, compreende desde o Maranhão até São Paulo, além de focos isolados em outros Estados (Coura & Amaral, 2004) (Figura 1). Apesar dos sucessivos programas de controle da esquistossomose, realizados no Brasil o que resultou na redução da morbidade e mortalidade, a doença se encontra em expansão adquirindo um novo perfil epidemiológico (Barbosa *et al*, 2000) atingindo áreas até então consideradas indenes (Marques, 1979). Cabe aqui salientar que a redução da prevalência e morbidade deve-se principalmente pelo

tratamento das populações e em virtude da quimioterapia, a maioria das regiões do Brasil vem sendo considerada áreas de baixa prevalência.

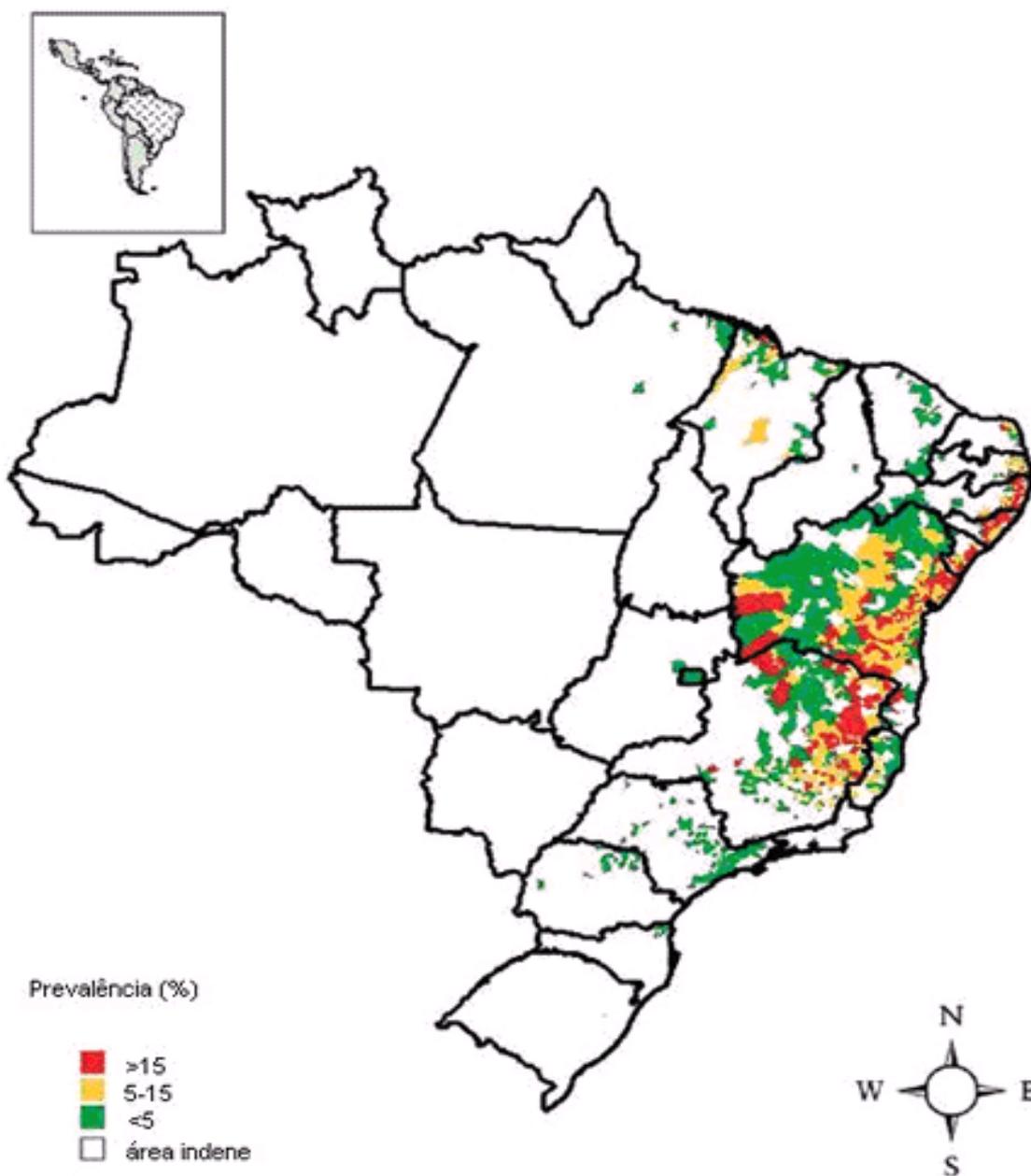


Figura 1: Distribuição da esquistossomose de acordo com a faixa de prevalência, no Brasil (Fonte: Amaral, *et al.*, 2006)

Entretanto o modelo de levantamento realizado há alguns anos com 1 lâmina de Kato-Katz, subestima significativamente a prevalência atual. Recentemente, novas ferramentas para o diagnóstico da esquistossomose estão sendo estudadas a fim de melhorar a sensibilidade da metodologia de diagnóstico atual. Enk *et al*, (2008) indicaram em seus estudos que a adoção

do diagnóstico denominado “Padrão Ouro” constitui uma estratégia que aumenta consideravelmente a prevalência da doença quando comparada com os resultados obtidos apenas com 1 lâmina de KK. Ao analisarem um número maior de lâminas KK e amostras de fezes em dias diferentes, estes autores observaram que a prevalência aumentou de 13% para 27%. Este aumento foi mais acentuado ainda quando comparado com os resultados encontrados pelo método de diagnóstico “Padrão Ouro” que associava outros exames com mais exames parasitológicos, onde a prevalência alcançou 35,4%. O mesmo foi observado por Siqueira *et al*, (2011) que demonstrou um aumento de 4,5 vezes na prevalência da doença na população estudada ao utilizar o “Padrão Ouro”.

Quanto aos fatores de expansão da esquistossomose destacam-se a carência de saneamento básico que pode estar associado ao ritmo de crescimento populacional e à ocupação desordenada dos espaços urbanos, à migração de portadores do parasito para áreas indenes (Barbosa *et al*, 1996), a dispersão dos moluscos transmissores (Paraense & Corrêa, 1987), além dos distúrbios provocados pela modificação irracional dos ecossistemas primitivos (Silva, 1997). Steinmann *et al* (2006) ressaltam que o aumento considerável do número de pessoas associadas ou vivendo próximas à regiões de intensa irrigação e grandes reservatórios de água é um importante fator de risco de transmissão de esquistossomose. A construção de grandes represas pelo homem tem se tornado um fator de risco eminente de transmissão da doença no Brasil (Fernandez & Thiengo 2002,2006). Segundo Barbosa (1998) a compreensão da ocorrência e causalidade de doenças como a esquistossomose deve levar em consideração a estrutura espaço-temporal que é historicamente, socialmente e culturalmente construída pelas populações, além da interdependência de diferentes variáveis no processo de transmissão. A associação destes fatores pode ter contribuído para um aumento do número de casos de esquistossomose em São Paulo. O intenso processo de industrialização e crescimento econômico atraíram um grande número de pessoas em busca trabalho intensificando assim o processo de urbanização sem saneamento básico adequado.

Os primeiros casos autóctones de esquistossomose registrados no Estado de São Paulo foram detectados em 1923, na Baixada Santista (Arantes, 1924). A esquistossomose mansoni foi introduzida no Estado, graças à migração de indivíduos originários das áreas endêmicas do nordeste, principalmente da Bahia, Pernambuco, Alagoas e Sergipe assim como da porção setentrional do Estado de Minas (Barbosa, 1970). Esta corrente migratória se intensificou com o surto de industrialização verificado a partir do final da década de 1940, justamente quando a esquistossomose passou a ser reconhecida como problema de saúde pública. Durante o período de 1990 a 2002, foi notificada no Estado de São Paulo uma média de 7834 casos por

ano (Souza *et al*, 2007). Desde os últimos 10 anos o Estado vem sendo considerado uma região de baixa prevalência sendo que os casos autóctones correspondem a 10% e as taxas de infecção natural dos moluscos ficam em torno de 1% (São Paulo, 2009). Entretanto, no mesmo período, foram registrados em média 2 mil casos por ano e foram identificados 248 criadouros das espécies *Biomphalaria spp.* Destes, 170 registraram casos autóctones e 20% apresentavam caramujos positivos com transmissão focal para *S.mansoni*. Vale ressaltar que o crescente número de casos importados registrados no Estado caracteriza um sinal de alerta com risco de transmissão das populações residentes próximas das coleções hídricas colonizadas por caramujos transmissores em que as condições de saneamento básico ainda são precárias (Eduardo, 2008; BEPA, 2009; SES-SP, 2009; São Paulo, 2009, 2010).

Atualmente, existem focos da esquistossomose em diversos Municípios dos vales dos rios Ribeira de Iguapé e Paraíba do Sul, do Litoral Paulista e das regiões metropolitanas de Campinas e da Grande São Paulo. A maior parte dos casos autóctones de esquistossomose, diagnosticados em território paulista, resulta dos contatos com ambientes hídricos colonizados por *B. tenagophila* (d'Orbigny, 1835). (SUCEN, 1995; Glasser, 1995; Teles *et al*, 2002ab, 2003; Teles, 2005).

O Município de Bananal é um dos 29 Municípios paulistas considerados estâncias turísticas pelo Estado de São Paulo. O nome do Município seria uma corruptela da palavra indígena 'banani', que significa 'sinuoso', entretanto outras versões ao nome podem ser encontradas. O desenvolvimento econômico e aumento populacional neste Município devem-se à introdução da cultura do café. O Município cresceu e se enriqueceu com as fazendas de café (Chieffi & Waldman, 1988). Dos tempos anteriores ficaram muitos e valiosos monumentos entre eles a "Farmácia popular", antiga farmácia imperial fundada em 1830. Após um período de estagnação econômica Bananal procura se reerguer atraindo turistas, não só para conhecer sua história de pompa e riqueza passados, cujos testemunhos são os belos sobrados da cidade e os casarões de suas fazendas, como também para desfrutar das belezas naturais da serra da Bocaina, onde fica a maior reserva brasileira de mata Atlântica assim como a riqueza do artesanato local atraindo turistas de diferentes locais durante todo o ano (Vnews, 2010). O primeiro foco de esquistossomose no Município foi identificado em 1976 e até o período de 1983 já haviam sido registrados aproximadamente 900 casos autóctones (Chieffi & Waldman, 1988). Nesta região, o contato dos habitantes com águas poluídas por fezes humanas e colonizadas por *B. tenagophila* ainda é frequente, principalmente na região urbana. No período de 1999 a 2001 a positividade das amostras fecais analisadas no Município foi 2,7%, sendo observada uma variação 1,1% a 10,3% na positividade de acordo

com o distrito investigado (Teles *et al*, 2001). Esta prevalência refletiu o intenso levantamento malacológico realizado em Bananal durante o período de 1998-2000 onde foram delimitados e identificados os focos de transmissão da esquistossomose (Teles *et al*, 2002). Somente neste período foram diagnosticados e notificados 300 casos da doença (SUCEN, 2006; Teles, 2006). O desenvolvimento de um plano específico para Bananal em que foram implantadas ações de controle tais como aplicação de moluscicida nos focos ativos, identificação/tratamento dos portadores, melhorias no sistema de saneamento básico e aprimoramento dos métodos diagnósticos contribuiu para a redução da prevalência da doença a 1%. Desde então Bananal pode ser considerada uma área de prevalência muito baixa.

1.2 Ciclo de transmissão

Schistosoma mansoni possui um ciclo biológico complexo (Figura 2) compreendido por uma fase de reprodução sexuada, no hospedeiro vertebrado; outra assexuada no hospedeiro intermediário, além de duas fases de vida livre (miracídeos e cercárias). As cercárias são as formas infectantes para os hospedeiros vertebrados e emergem de moluscos do gênero *Biomphalaria* presentes em coleções hídricas. Em contato com a água, as cercárias nadam ativamente até encontrar um hospedeiro vertebrado suscetível. Em contato com o hospedeiro, ela inicia o processo de penetração que pode durar de 5 a 15 minutos. Antes da penetração as cercárias passam por uma importante etapa de adesão, caracterizada pela associação de movimentos mecânicos, fixação da ventosa na pele do hospedeiro e a produção de secreções proteolíticas. Por volta de três horas após a penetração, as cercárias já perderam a cauda e passam por adaptações morfológicas importantes transformando-se em esquistossômulos. Estes, por motivos que não foram totalmente elucidados, alcançam os vasos sanguíneos e são direcionados para o coração, pulmão e fígado, onde alcançam a maturidade por volta dos 28 dias após a infecção. A migração dos mesmos (dos pulmões para o sistema porta hepático) ainda é discutida, sendo as vias intravasculares melhor comprovadas. Por volta da terceira semana após a infecção os esquistossômulos direcionam-se para as veias mesentéricas inferiores onde ocorre o acasalamento. A fêmea inicia a ovoposição entre o 30º e 34º dias de infecção e pode eliminar cerca de 300 ovos a cada dia. Cerca de 50% dos ovos eliminados pelas fêmeas alcançam a luz intestinal e são eliminados juntamente com as fezes (a partir do 35º dia já podem ser identificados ovos nas fezes), enquanto parte deles ficam retidos no fígado e intestino dos hospedeiros induzindo a formação de granulomas (Lenzi, *et al*, 2008).

Quando os ovos maduros de *S. mansoni* liberados na massa fecal atingem as coleções hídricas, condições ideais de luminosidade e temperatura induzem a eclosão dos miracídios (larvas ciliadas) que são as formas infectantes dos hospedeiros intermediários (moluscos do gênero *Biomphalaria*). Os miracídios têm um tempo curto de vida (aproximadamente 8 horas) e seu sistema nervoso primitivo garante os movimentos natatórios essenciais para facilitar seu encontro com o hospedeiro intermediário e posteriormente a sua penetração. A penetração se dá através das partes expostas do molusco, preferencialmente pé e base do tentáculo (Coelho, 1957) e está condicionada á diferentes fatores como, temperatura, luminosidade, aspectos comportamentais, químicos e morfológicos da larva. No processo de penetração, o terebratório, estrutura localizada na extremidade anterior, assume a função de ventosa garantindo a fixação da mesma no molusco. As movimentações intensas do miracídio associada à descarga das glândulas de adesão e penetração garantem a invasão do tecido em um período que varia de 10 a 15 minutos. Após a penetração, o miracídio perde suas placas ciliares e num período de 48 horas a larva perde totalmente seus movimentos, sendo denominada de esporocisto primário que contém de 50 a 100 células germinativas. Estas células darão origem aos esporocistos secundários e destes, por reprodução assexuada, a milhares de cercárias. O desenvolvimento completo de *S. mansoni* em moluscos do gênero *Biomphalaria* pode durar de 27 a 30 dias em condições ideais de temperatura. De um único miracídio podem ser originadas cerca de 300 mil cercárias (Faust & Hoffman, 1934), que se entrarem em contato com a pele e mucosas do hospedeiro vertebrado reiniciam o ciclo (Coelho, *et al*, 2008).

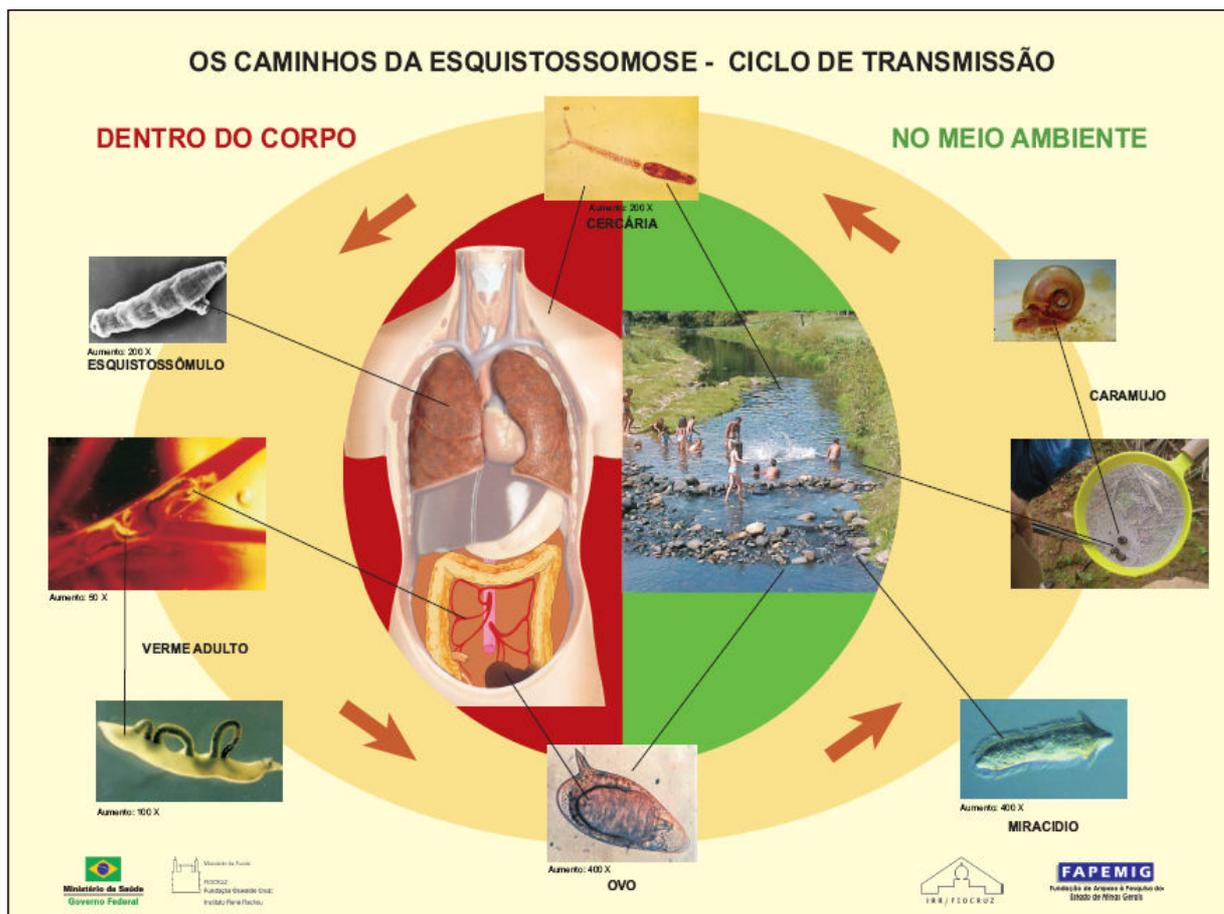


Figura 2: Ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*. Fonte: Schall *et al.*, 2007 – Cartilha: Os caminhos da Esquistossomose dentro do nosso corpo.

1.3 Hospedeiros Intermediários

1.3.1 Importância Epidemiológica do Gênero *Biomphalaria*

Para o gênero *Biomphalaria* (Mollusca: Pulmonata, Planorbidae) são reconhecidas 26 espécies e uma espécie neotropicais (Silva, 2012). Várias delas são hospedeiras intermediárias do *S. mansoni* que variam quanto à suscetibilidade ao parasito (Souza *et al.*, 1995), morfologia, biologia e distribuição geográfica.

Das espécies de *Biomphalaria* referenciadas, onze espécies e uma subespécie ocorrem no Brasil, são elas: *B. glabrata* (Say, 1818), *B. tenagophila* (d'Orbigny, 1835), *B. straminea* (Dunker, 1848), *B. amazonica* Paraense, 1966, *B. peregrina* (d'Orbigny, 1835) *B. occidentalis* Paraense, 1981, *B. intermedia* Paraense & Deslandes, 1962, *B. schrammi* (Crosse, 1864), *B. oligoza* Paraense, 1975, *B. kuhniana* (Clessim, 1883), *B. tenagophila guaibensis* Paraense, 1984 e *Biomphalaria cousini* Paraense, 1966, recentemente encontrada no país (Caldeira *et al.*,

2010). No Brasil, as três primeiras espécies são responsáveis pela ocorrência da esquistossomose mansoni sendo encontradas naturalmente infectadas e eliminando cercárias (Paraense, 1972). Além disso, *B. amazonica*, *B. peregrina* e *B. cousini* são consideradas hospedeiras em potencial do *S. mansoni*, pois podem ser infectadas experimentalmente (Paraense & Corrêa, 1973; Teodoro *et al*, 2010). As espécies de *Biomphalaria* transmissoras do *S. mansoni* têm ampla distribuição no Brasil e estão muito bem adaptadas aos diferentes ambientes. Atualmente, o geoprocessamento tem sido proposto como uma ferramenta importante para remapear a distribuição das espécies de *Biomphalaria* no Brasil (Carvalho *et al*, 2008; Guimarães *et al*, 2010; Carvalho *et al*, 2010).

Entre os hospedeiros intermediários *B. glabrata* é uma espécie de grande importância epidemiológica, considerada a principal transmissora do *S. mansoni* no Brasil. Esta tem como localidade-tipo Guadalupe, na América Central (Pilsbry, 1934). Também foi encontrada na Venezuela, Suriname e Guiana Francesa (Malek, 1985). Sua distribuição é ampla e coincide com a prevalência da esquistossomose mansoni. *B. glabrata* já foi notificada nos Estados de Alagoas, Bahia, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Minas Gerais, Pará, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, São Paulo, Sergipe e no Distrito Federal (Paraense, 2001; Carvalho, 2008). A ocorrência de *B. glabrata* no Município de Esteio Rio grande do Sul, localizada na região metropolitana de Porto Alegre, demonstra a distribuição progressiva desta espécie (Carvalho *et al*, 1998).

Biomphalaria tenagophila tem como localidade tipo a Província de Corrientes, na Argentina. No Brasil, é considerada a segunda espécie de importância na transmissão da esquistossomose mansoni (Paraense & Corrêa, 1987), encontrada em 603 Municípios de 10 Estados brasileiros (Bahia, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, Santa Catarina e São Paulo, além do Distrito Federal. Em Minas Gerais, exemplares de *B. tenagophila* naturalmente infectados foram identificados nos municípios de Jaboticatubas, Itajubá, Belo Horizonte e Ouro Branco (Melo & Pereira 1985, Carvalho *et al*, 1985a; Silva *et al*, 1994). Casos autóctones de esquistossomose registrados no Estado de São Paulo têm sido atribuídos a esta espécie que pode ser encontrada em coleções hídricas de todas as bacias hidrográficas (Teles, 2005).

B. straminea é a espécie com distribuição geográfica mais extensa no país, sendo predominante no Nordeste. É encontrada no Distrito Federal e em todos os Estados, exceto no Amapá e Rondônia (Paraense, 1986). As taxas de infecção natural ao *S. mansoni* são inferiores a 1%, contudo são capazes de manter elevadas taxas de infecção humana em determinadas áreas do Nordeste (Paraense & Corrêa, 1963). Em décadas passadas, os

Municípios de Gameleira, Vicência, Escada e Ribeirão, no Estado de Pernambuco, apresentavam índices de positividade para esquistossomose de 70% a 90% e a espécie transmissora era *B. straminea*. Focos isolados da doença também foram assinalados nos Municípios de Pacoti, Quixadá, Redenção e Juazeiro do Norte, no Estado do Ceará (SUCAM, 1974).

A ampliação dos conhecimentos sobre a distribuição geográfica das espécies brasileiras do gênero *Biomphalaria* é de fundamental importância para orientar as medidas de controle da esquistossomose. Para tanto é necessário realizar uma identificação minuciosa destes hospedeiros intermediários, bem como a detecção de espécies infectadas e/ou potencialmente transmissoras do *S. mansoni*. Durante muito tempo vem sendo utilizada a identificação dos moluscos através da morfologia comparada das conchas, anatomia dos órgãos do aparelho reprodutor e da presença de crista renal. A detecção do parasito através do exame dos moluscos após exposição a um estímulo luminoso ou esmagamento entre placas de vidro também são utilizadas na rotina laboratorial. Nos últimos anos, uma nova abordagem na identificação das espécies de *Biomphalaria* e detecção do parasito vêm ganhando destaque e contribuindo para o conhecimento acerca da epidemiologia da esquistossomose mansoni. Trata-se da epidemiologia molecular que visa uma associação de técnicas moleculares na identificação e detecção do parasito baseadas na PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (Traub *et al*, 2005). Estas técnicas tornaram-se essenciais na identificação de espécimes muito pequenas, que apresentam similaridades fenotípicas ou que tenham sido coletadas e fixadas de forma inadequada (Caldeira *et al*, 2009). Portanto, são usualmente empregadas em diferentes projetos de pesquisa no Centro de Pesquisas René Rachou pelo laboratório de referência nacional em esquistossomose ênfase em exame e identificação dos moluscos brasileiros do gênero *Biomphalaria*.

Outra abordagem molecular que pode contribuir na identificação e taxonomia entre espécies de *Biomphalaria* e que vem sendo alvo de estudos é a construção de uma “DNA barcoding” (código de barras de DNA) que é caracterizado pela universalização na identificação das espécies, baseado na obtenção e armazenamento em banco de dados de seqüências de DNA mitocondrial, particularmente utilizando a subunidade I do gene citocromo oxidase (COI) (De Salle *et al*, 2005; Davison *et al*, 2009). Por meio da utilização de parte do fragmento do gene COI foi possível avaliar a diversidade molecular de *B. tenagophila* de diferentes bacias hidrográficas do Estado de São Paulo, identificar valores de divergência inter e intra populacionais bem como identificar espécies de caramujo (Zanna, 2010).

Nos últimos anos, os trabalhos que envolvem o sequenciamento do mtDNA dos caramujos do gênero *Biomphalaria* estão sendo ampliados devido a grande possibilidade de utilização deste genoma em estudos genéticos e evolutivos por apresentar segmentos conservados intercalados por segmentos variáveis de poucas bases de DNA (Barros-Battesti *et al*, 2006). Atualmente, encontram-se disponibilizadas no GeneBank uma série de sequências completas e parciais de mtDNA. Para o gênero *Biomphalaria*, apenas *B. glabrata* e *B. tenagophila* do Taim, resistente ao *S.mansoni*, encontram-se completamente sequenciados, ambos apresentando diferenças no número de nucleotídeos e semelhanças entre si e com os metazoários quanto à predição de genes: 22 RNAs mensageiros, 13 RNAs transportadores e 2 RNAs ribossômicos. (De Jong *et al*, 2004; Jannotti-Passos *et al*, 2007; NCBI/NLM, 2012).

1.3.2 Aspectos morfológicos e bioecológicos do gênero *Biomphalaria*

A bioecologia das principais espécies transmissoras da esquistossomose mansoni vem sendo amplamente estudada há décadas (Barbosa & Barbosa, 1994). Autores pioneiros como Brumpt (1941) e Perlowagora (1958) possibilitaram o conhecimento sobre a biologia de *B. glabrata*, enquanto Rey (1956), Magalhães *et al* (1968), Magalhães & Carvalho (1969) e Magalhães & De Lucca (1971), ampliaram as informações sobre a biologia de *B. tenagophila* que já nesta época recebia destaque como espécie responsável pela transmissão da esquistossomose no Estado de São Paulo (Kawazoe, 1976, 1977).

Moluscos do gênero *Biomphalaria* possuem um habitat diversificado e amplo (Barbosa & Barbosa, 1994). Podem ser encontrados em coleções hídricas naturais ou artificiais de água doce, parada ou pouco corrente, tais como lagoas, lagos, poças, cisternas, pântanos, banhados, remansos de rios, riachos, canais de irrigação e drenagem, açudes, plantações ou em quaisquer áreas alagadas (Paraense, 1970; Pieri, 1995). A vegetação macrofítica associada aos criadouros é fundamental para manutenção de um microclima de proteção contra radiação solar, altas temperaturas e correntezas. Os moluscos vivem preferencialmente em águas rasas tendo como substratos o leito lodoso ou rochoso, e a vegetação enraizada ou flutuante onde são depositadas suas desovas (Brasil, 2008). Características comuns aos habitats podem ser observadas tais como, riqueza de microflora e matéria orgânica, pouca turbidez, luminosidade, pH entre 6 e 8, teor de sal abaixo de 0,3% e temperatura média em torno de 20 a 25° C. A alimentação dos caramujos aquáticos depende do substrato, o qual o caramujo raspa com auxílio de sua rádula, e ingere materiais de vários tipos, tais como o limo (que contém algas, bactérias e outros microrganismos), o lodo (rico em matéria orgânica e sais minerais), as folhas e vegetais em decomposição e o excremento de outros animais (Paraense, 1972; Freitas, 1973; Pieri, 1995).

Estudos ecológicos básicos demonstram que a dinâmica populacional de *Biomphalaria* apresenta-se instável na distribuição e densidade em função de pressões ambientais, por vezes sazonais, associadas ou não com atividades antrópicas tais como aterramentos, alterações dos cursos d'água, poluição, variações de temperatura e chuva (Barbosa & Barbosa, 1994).

Um dos aspectos ecológicos importantes para a sobrevivência de moluscos do gênero *Biomphalaria* em condições desfavoráveis é a capacidade de sobreviver fora da água por longos períodos através da retração das partes moles dentro da concha impedindo a dessecação por formação de uma película impermeável que age impedindo a perda de água. Esta capacidade depende entre outros fatores da habilidade individual na conservação dos recursos energéticos e de eliminar ou neutralizar as toxinas do próprio metabolismo (Brasil, 2008). Inúmeros trabalhos foram publicados demonstrando a capacidade da *Biomphalaria* em diminuir sua atividade metabólica durante períodos críticos e recolonizar coleções hídricas climaticamente afetadas (Brumpt, 1941; Barbosa & Dobbin Junior, 1952a; Olivier & Barbosa, 1955a; Paraense, 1955; Barbosa, 1956; Barbosa & Olivier, 1958; Pieri *et al*, 1980; Barbosa *et al*, 1985; Teles & Marques, 1989).

Os moluscos do gênero *Biomphalaria* são hermafroditas e possuem uma alta capacidade proliferativa. Quando isolados são capazes de realizarem autofecundação, embora realizem preferencialmente a fecundação cruzada quando estão em contato com outro indivíduo da mesma espécie ou em colônia, o que garante maior variabilidade genética (Paraense & Deslandes, 1955). Diversos cruzamentos realizados com *B. glabrata* albina e pigmentada evidenciaram que a reprodução por fecundação cruzada é quase que exclusiva e constitui o modo natural de reprodução da espécie.

B. glabrata, *B. tenagophila* e *B. straminea* são espécies muito férteis e fecundas. Kawazoe (1977) observou que a fecundidade em *B. glabrata* foi maior quando comparada com as demais espécies. Entretanto, Costa *et al*, (2004) demonstraram resultados diferentes, ao comparar a fecundidade e a fertilidade de *B. glabrata* e *B. straminea* originária de valas de irrigação em zonas rurais de Pernambuco, já que em seus experimentos ficou evidenciada maior fecundidade e fertilidade em *B. straminea*.

Variações de fecundidade e fertilidade entre as espécies de *Biomphalaria* podem estar associadas com o crescimento dos órgãos reprodutores. Experimentos realizados por Monteiro & Kawano (1998) evidenciaram diferenças entre o número de divertículos da próstata e folículos do ovotestis, sendo maiores em *B. glabrata* do que em *B. tenagophila*.

A infecção pelo *S. mansoni* afeta significativamente a sobrevivência da *B. glabrata* (Olivier *et al*, 1954). A “castração parasitária” ou redução na produção de ovos em *Biomphalaria* infectada por *S. mansoni* já foi observada por diferentes autores (Pan, 1965; Meuleman, 1971; Crews & Yoshino, 1989). Sturrok (1966) ao avaliar o efeito da infecção por *S. mansoni* sobre a taxa de crescimento e reprodução de *Biomphalaria pfeifferi* observou que a larva do parasito utiliza-se de muitos nutrientes do hospedeiro que são fundamentais para o funcionamento das gônadas levando-o à “castração parasitária” que pode resultar na inibição temporária ou total da produção de ovos. Paraense & Corrêa (1978) observaram que em *B. tenagophila* infectada há um maior investimento da atividade reprodutiva na fase pré-patente que gradativamente se reduz até a parada de postura de ovos. Guimarães *et al*, (2010) avaliaram o efeito da infecção experimental de *B. tenagophila* por *S. mansoni*. Neste estudo foi observado que durante o período patente os moluscos apresentaram uma menor atividade reprodutiva, alta mortalidade e uma fragilidade das conchas. Por outro lado, o grupo de *B. tenagophila* não infectado não apresentou estas variações.

Cooper *et al*, (1996) também observaram a redução na taxa de postura de ovos em *B. glabrata* infectada além da atuação masculina evidenciada pela transferência de esperma para outro indivíduo. Estudos sobre o investimento da função masculina em *B. tenagophila* demonstraram que os hermafroditas simultâneos reúnem em um único indivíduo conflitos de investimento na função masculina e feminina em função da assimetria de investimento energético apresentados pelos gametas, ou seja, podem surgir conflitos de interesse reprodutivo entre machos e fêmeas no processo em que cada um assume riscos de perda e ganho na troca de gametas para reprodução (Monteiro & Dias 1989).

B. glabrata pode ser considerada madura apenas após a produção das primeiras desovas auto fertilizadas (Vernon & Taylor, 1996). Entretanto, um indivíduo pode ser protândrico quando ele atua primeiro como macho e depois como fêmea, sem posterior reversão de sexo. Trigwell & Dussart (1998) observaram que organismos hermafroditas simultâneos como *B. glabrata* podem atuar como machos, doando esperma para outro indivíduo por um período de duas semanas antes da maturação do sistema reprodutor feminino e das primeiras ovoposições denominando este evento de protândria funcional, já que os órgãos masculinos amadurecem antes dos femininos.

1.4 Relação *Biomphalaria-Schistosoma mansoni*

Um dos fatores que influencia a suscetibilidade de *Biomphalaria* à infecção por *S.mansoni* é a capacidade que o sistema interno de defesa deste hospedeiro tem de reconhecer e montar uma defesa contra o parasito invasor (Bayne, 2009).

A interação do parasito-hospedeiro e amplas variações na suscetibilidade dos moluscos podem também serem influenciadas pela existência de diferenças fisiológicas entre os mesmos, além de fatores ambientais, por aspectos comportamentais do miracídio e do caramujo. De acordo com Paraense & Corrêa (1963) a inter-relação de parasitos e hospedeiros intermediários dependem de ajustes fisiológicos. Em seus estudos foi evidenciado que *B. tenagophila* de São Paulo não foi suscetível ao *S. mansoni* adaptado à *B. glabrata* de Minas Gerais e vice-versa, evidenciando a existência de duas cepas distintas e separadas geograficamente.

A resistência de *B. tenagophila* assim como de *B. glabrata* também está associada a fatores genéticos. Nos vales do Paraíba do Sul e Ribeira, áreas dos principais focos endêmicos da esquistossomose em São Paulo, as populações de *B. tenagophila* apresentam índices de suscetibilidade elevados às cepas locais do *S. mansoni*. Isto pode significar um ajustamento fisiológico bem sucedido das linhagens locais de caramujos a essas cepas do parasito e vice-versa (Chieffi, 1975). *B. tenagophila* de 18 localidades apresentaram taxas de infecção que variavam de 0 a 91,5% quando expostos à cepa SJ de *S. mansoni* (Paraense & Corrêa, 1978). Estudos posteriores confirmaram que as variações nas taxas de infecção apresentada por *B. tenagophila* também está relacionada à cepa SJ de *S. mansoni* (São José dos Campos-SP). Corrêa *et al*, (1979) verificaram que exemplares de *B. tenagophila* coletados em Belo Horizonte-MG e Cabo Frio-RJ mostraram-se suscetíveis quando desafiados com cepa SJ de *S. mansoni* e resistentes quando infectados com a cepa LE de Belo Horizonte. A maior taxa de infecção experimental da cepa SJ foi demonstrada por estes autores que obtiveram 100% de positividade dos exemplares *B. tenagophila* da linhagem Cabo Frio (RJ). Outros estudos experimentais realizados com *B. tenagophila* provenientes da Lagoa da Pampulha, em Belo Horizonte, com diferentes cepas de *S. mansoni*, mostraram uma taxa de infecção de 4% (cepa LE), 6% (cepa HK), 30% (cepa SJ) e 40% (cepa AL) (Souza *et al*, 1987).

Santos *et al*, (1979) identificaram pela primeira vez uma linhagem geográfica de *B. tenagophila* absolutamente resistente ao *S. mansoni*. Esta linhagem foi coletada na Estação Ecológica do Taim-Rio Grande do Sul e vem sendo alvo de muitos estudos.

Ensaio envolvendo o cruzamento de *B. tenagophila* Taim com exemplares suscetíveis de *B. tenagophila* de Belo Horizonte- MG e Joinville-SC mostraram que descendentes F1 resultantes de tais cruzamentos apresentavam índices baixíssimos de suscetibilidade ao *S. mansoni* (Santos *et al*, 1979; Freitas *et al*, 1985).

Biomphalaria tenagophila do Taim permanece resistente em todas as idades, a várias cepas de *S. mansoni* e a diferentes cargas de miracídeos (Coelho *et al*, 2004). Tentativas sem sucesso de quebra da resistência desta linhagem foram realizadas, como por exemplo, a radiação gama, adição de sílica e co-infecção por outros parasitos. (Bezerra *et al*, 2003; Martins-Souza *et al*, 2003; Pereira *et al*, 2006).

Bezerra *et al*, (1997) demonstraram que a linhagem resistente *B. tenagophila* do Taim exposta ao *S. mansoni*, apresenta uma redução de hemócitos circulantes e uma intensa reação celular no sítio da infecção, durante as primeiras horas de infecção. Alguns estudos evidenciaram que hemócitos das linhagens *B. tenagophila* do Taim (resistente) e *B. tenagophila* de Cabo Frio (susceptível) ao *S. mansoni* expressam receptores (carboidratos) para lectinas. Uma grande quantidade de hemócitos destas duas linhagens mostraram-se marcados por lectinas do tipo ConA, SBA, PNA e WGA estando estas duas últimas em maior proporção. A infecção por *S. mansoni* altera a proporção de células marcadas por lectinas, sendo reduzida na linhagem do Taim em apenas 5 horas (Martins-Souza, 2006). Estes resultados suportam a hipótese de que a ligação carboidrato/lectina promoveria a ativação de hemócitos para destruição do parasito no sítio da infecção, já que foi observada uma intensa reação celular em torno do parasito na linhagem resistente (Negrão-Corrêa *et al*, 2007; Coelho *et al*, 2008).

A importância dos hemócitos no controle da infecção também foi diretamente demonstrada quando linhagens de *B. tenagophila* suscetíveis receberam o transplante da região do APO de *B. tenagophila* do Taim, linhagem resistente ao *S. mansoni*. Os exemplares suscetíveis transplantados, nos quais o transplante foi bem sucedido, apresentaram-se resistentes à infecção por *S. mansoni* (Barbosa *et al*, 2006).

Outros pesquisadores também demonstraram a importância dos fatores solúveis da hemolinfa ao transferir a hemolinfa livre de hemócitos da *B. tenagophila* Taim (resistente) para a linhagem suscetível *B. tenagophila* Cabo Frio (Coelho & Bezerra, 2006). Os estudos *in vitro* confirmaram o efeito protetor da hemolinfa da linhagem resistente durante a interação entre hemócitos e esporocistos já que esta causou um aumento significativo da mortalidade

dos esporocistos quando comparada com a hemolinfa de *B. glabrata* (suscetível) (Pereira, 2008).

Vidigal *et al*, (1998) identificaram o perfil das três espécies Brasileiras de *Biomphalaria* através da análise da região ITS (*Internal transcribed spacer*) de rDNA utilizando a técnica PCR-RFLP (*Polimerase Chain Reaction and Restriction Fragment lenght Polimorphism*), sendo os melhores perfis obtidos com a enzima de restrição DdeI. Vidigal *et al*, (2000) empregaram esta técnica para obtenção do perfil de restrição de 10 espécies e 1 sub-espécie de *Biomphalaria* Brasileiras. De acordo com estes autores, *B. tenagophila* de diferentes localidades compartilham um perfil de 2 fragmentos, sendo um de 800pb e outro de 470pb. Entretanto, *B. tenagophila* do Taim (resistente ao *S. mansoni*) demonstra um perfil diferenciado e exclusivo, apresentando um terceiro fragmento de 350pb, de caráter dominante (Barbosa *et al*, 2001, 2006; Rosa *et al*, 2004, 2006; Coelho *et al*, 2008). Este marcador molecular não apresenta relação com a resistência ao parasito, sendo apenas uma região espaçadora que vem sendo utilizada para monitorar o sucesso do cruzamento entre a linhagem *B. tenagophila* do Taim e linhagens suscetíveis em ensaios laboratoriais e de campo.

Rosa *et al*, (2005) realizaram vários cruzamentos entre a linhagem resistente (*B.tenagophila* Taim) com a suscetível albina (*B. tenagophila* Joinville, SC). Estudando o fenótipo dos descendentes F1 e F2 destes cruzamentos, verificou-se que o caráter resistência pode estar sendo determinado por dois genes dominantes e modulado por fatores ambientais. Todos os descendentes F1 foram resistentes à infecção, enquanto a suscetibilidade no grupo F2 foi de 8% com baixa e descontínua produção de cercárias nestes indivíduos. Um estudo sobre a dinâmica populacional realizado por Rosa *et al* (2006) avaliaram a transmissão do caráter de resistência, fecundidade e taxa de sobrevivência de uma população mista de *B. tenagophila* formada por indivíduos suscetíveis e resistentes mantidos em diferentes proporções submetidos ou não à infecção pelo *S. mansoni*. Foi demonstrado que o parasitismo por *S. mansoni* exerce uma pressão seletiva negativa nas populações suscetíveis. Ao contrário, a população resistente não foi afetada quando infectada pelo *S. mansoni* e *B. tenagophila* do Taim foi mais fecunda do que a linhagem suscetível *B. tenagophila* Joinville. As taxas de sobrevivência da população resistente, independente da infecção, foram reduzidas apenas quando mantida junto com uma maioria de caramujos suscetíveis. Contudo, mesmo nos grupos em que linhagem *B. tenagophila* do Taim estava em desvantagem, a transmissão do caráter resistência ocorreu de forma eficiente, pois grande parte dos indivíduos das progênes F1, F2 e F3 foram resistentes ao *S. mansoni*.

Recentemente, Mattos *et al*, (2011) avaliaram a capacidade de resposta do Sistema Interno de Defesa (ISD) das linhagens *B. tenagophila* Taim (resistente) *B. tenagophila* Cabo Frio (suscetível) frente aos esporocistos primários transformados *in vitro* e esporocistos secundários obtidos de *B. glabrata*. Neste estudo foi avaliado o índice de adesão celular (CAI) além da análise de viabilidade/mortalidade dos esporocistos após o contato com os componentes do ISD das diferentes linhagens utilizando marcadores fluorescentes. De acordo com estes autores, *B. tenagophila* do Taim foi mais efetiva contra esporocistos primários e secundários que a linhagem suscetível e *B. glabrata*. Demonstraram ainda que esporocistos primários de *B. tenagophila* apresentaram um maior índice de adesão celular e mortalidade quando comparado com esporocistos secundários. Desta forma sugere-se a ocorrência de mecanismos adicionais envolvidos com a absoluta resistência desta espécie à infecção pelo *S. mansoni*. As técnicas empregadas por estes pesquisadores possibilitarão a realização de experimentos que possam demonstrar a atuação e comportamento dos carboidratos presentes na superfície do parasito no mimetismo molecular em função de seus estádios evolutivos no hospedeiro intermediário.

1.5 Controle biológico da esquistossomose

As estratégias de controle da transmissão, morbidade e mortalidade da esquistossomose envolvem controle de moluscos, quimioterapia e medidas de educação e saneamento (Brasil, 2008). O controle dos moluscos vetores pode ser classificado em: químico, que envolve a aplicação de moluscidas em criadouros; biológico, que consiste em introduzir organismos com ação predadora, competidora, parasitária ou patogênica para os moluscos e físicos ou ambientais, que são modificações que visam eliminar ou inviabilizar os focos de transmissão (Brasil, 2008). Em menor ou maior grau, ao longo dos anos, a maioria destas medidas continua sendo utilizada. Mesmo as que deixaram de ser utilizadas ainda são amplamente estudadas e revistas. A aplicação de moluscida, apesar do alto grau de toxicidade dos compostos sobre outros organismos do ecossistema (ecótopo) ainda é utilizado em criadouros de importância epidemiológica (Barbosa *et al*, 2008), pois reduz rapidamente a transmissão da esquistossomose em áreas de alta prevalência (Sturrock, 1995). Sua utilização é recomendada tanto para áreas urbanas quanto rurais onde os prejuízos ambientais causados pela aplicação do produto não sejam maiores que os resultados da própria atividade humana sobre o ambiente (Teles & Carvalho, 2008).

Desde 1950 são disponibilizados na literatura vários trabalhos que avaliam o emprego de diferentes organismos para um possível uso em controle biológico, principalmente em caráter experimental. Em condições experimentais patógenos como bactérias, protozoários e

fungos já foram sugeridos por alguns autores como organismos capazes de matar populações de *B. glabrata* e outros moluscos, afetando até mesmo suas desovas (Madsen, 1990).

Determinados parasitos também podem afetar a densidade populacional de *Biomphalaria*. Andrade & Campos (1969) observaram uma expressiva redução da população de *B. straminea* naturalmente infectados por oligoquetas do gênero *Chaetogaster*. Entre os predadores destacam-se as planárias, sanguessugas, insetos, crustáceos e peixes. Em experimentos laboratoriais, hirudíneos do gênero *Helobdella* mostram-se excelentes predadores de *B. glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila* recém-eclodidos, jovens e adultos (Gonçalves & Pellegrino, 1967; Guimarães *et al*, 1984). Pesquisadores demonstraram que larvas e adultos de três diferentes espécies de insetos do gênero *Belostoma* também foram capazes de alimenta-se de moluscos do gênero *Biomphalaria* em condições experimentais (Pereira *et al*, 1993; Armúa de Reyes & Estevez, 2006). Vários peixes também têm apresentado ação malacófaga sobre *B. glabrata* e *B. tenagophila* destacando espécies como *Tilapia melanopleura* (Andrade & Antunes, 1969) e *Geophagus brasiliensis* (Weinzettl & Jumberg, 1990). Quelônios sul-americanos *Chrysemys (Trachemys) dorbignii* e *Platemys spixii* também já foram descritos como predadores de *B. glabrata*. (Coelho *et al*, 1975).

Os principais trabalhos de campo foram realizados com espécies competidoras das famílias Ampullariidae e Thiaridae, principalmente nas ilhas do Caribe e Venezuela. Pointier *et al* (1991) introduziram 400 exemplares da espécie *Marisa cornuarietis* em quatro diferentes pontos do pequeno lago “Grand Etang” na ilha de Guadalupe, onde foi identificado um foco silvestre de *S. mansoni*. Foi evidenciado, durante o período observado que esta espécie reduziu a população de *B. glabrata* e seu parasito. No Rio de Janeiro, Giovanelli *et al* (2005) ao monitorarem uma população desta espécie em um canal de irrigação, observaram que a população foi reduzida após a introdução do molusco afro-asiático *Melanoides tuberculata* (Muller, 1774). Entre 1978 e 1980 foi realizado um programa de controle biológico contra *B. glabrata* na ilha de Santa Lúcia (Prentice, 1983). Foram introduzidos exemplares jovens de *Melanoides tuberculata* em sete pântanos drenados por pequenos riachos e nascentes, ambientes comumente utilizados no platío de inhame e agrião. Pointier *et al*, (1993) ao monitorarem todo este sistema hidrográfico não encontraram *B. glabrata* em locais amplamente colonizados pela espécie concorrente e vice-versa.

Milward de Andrade & Guimarães (1977) assinalaram reduções da densidade populacional de *B. glabrata* após introdução de *Pomacea haustum* em coleções hídricas de Calciolândia (Arcos, MG). Paralelamente, Milward de Andrade & Carvalho (1979) sugeriram a utilização destes mesmos competidores da família *Pilidae* no controle biológico de *B.*

glabrata. Estes autores introduziram 5421 exemplares de *Pomacea haustum* em cinco córregos e duas valas na localidade de Baldin/Minas Gerais (Brasil), no qual *B. glabrata* era predominante. Foi observado um decréscimo populacional dos planorbídeos e um aumento da densidade de *Pomacea* cujas densidades foram de até 20 exemplares por metro quadrado nos córregos e 121,6 exemplares por metro quadrado em valas.

Barbosa (1973) demonstrou em seus estudos de campo que *B. straminea* com alto grau de resistência, introduzida em áreas circunscritas habitadas exclusivamente por *B. glabrata*, substituiu totalmente esta última espécie. Este evento foi interpretado como exclusão competitiva sendo posteriormente testado e confirmado por outra pesquisa de campo realizada em uma bacia hidrográfica da Paraíba, por Figueiredo (1989b). Alguns estudos apontaram que ambas as espécies podem raramente se sobrepor vivendo em uma mesma região, mas dificilmente em sintonia (Barbosa & Olivier 1958; Barbosa, 1962; Paraense & Deslandes, 1955). De todos estes trabalhos, nenhuma espécie apresentou eficácia suficiente contra *Biomphalaria* que sustente a sua utilização em campanhas de controle da esquistossomose (Pointier & Jourdan 2000).

Recentemente, uma nova metodologia original de controle biológico da transmissão da esquistossomose tem sido apresentada. Trata-se da introdução em larga escala de *B. tenagophila* do Taim/RS (completamente resistente ao *S. mansoni*) nas coleções hídricas em que esta espécie seja a única transmissora. Entre as premissas que suportam esta nova metodologia destacam: a resistência absoluta de *B. tenagophila* do Taim ao *S. mansoni*, o caráter dominante desta resistência, a alta taxa de mortalidade e supressão da postura de ovos dos caramujos suscetíveis parasitados pelo *S. mansoni*, a preferência de *Biomphalaria* por reprodução cruzada e a descoberta de um marcador molecular típico da linhagem do Taim, também de caráter dominante com segregação tipicamente mendeliana, podendo ser detectado nos descendentes do cruzamento entre as linhagens de *B. tenagophila* resistente (introduzida) e as suscetíveis (locais) permitindo assim monitorar o sucesso da intervenção. Além disso, experimentos já demonstraram que os descendentes F2 do cruzamento entre a linhagem do Taim e linhagem suscetível que se infectam apresentam uma diminuição drástica na produção de cercárias e uma tendência para auto cura (Rosa *et al*, 2005). A introdução da linhagem do Taim não representa impacto ambiental relevante, por tratar-se da mesma espécie de organismo existente no ecossistema, o qual já se apresenta bastante alterado e descaracterizado por intervenções antrópicas, tais como: aterros, desvios de curso, alterações na vegetação aquática e, principalmente, pela descarga de esgotos domésticos.

A realização desta proposta só foi possível devido ao domínio da criação em larga escala da linhagem resistente ao *S. mansoni* localizada na Chácara Santa Inês situada no Município de Bananal, São Paulo que se iniciou em 2005 e vem sendo mantida com a parceria da SUCEN (Dr. Horácio Santana Teles) e do Dr. Engels Maciel, proprietário da chácara. Foram necessárias uma série de padronizações e adaptações para que fossem obtidos os primeiros exemplares.

A eficácia do modelo experimental de transferência da resistência da *B. tenagophila* da linhagem do Taim ao *S. mansoni* para linhagens locais suscetíveis, em coleções hídricas no Município de Bananal/SP foi primeiramente avaliada por Rosa (2008). Estes resultados demonstraram que há uma relação direta entre a proporção de caramujos locais e introduzidos para o sucesso da inserção do patrimônio genético da linhagem resistente. Sendo assim nas áreas de baixa densidade populacional da linhagem local, como foi o caso do córrego Santa Inês e Lava Pés, a linhagem resistente teve proporção suficiente para se estabelecer e transmitir aos caramujos locais o seu material genético, pois o fragmento de 350pb foi identificado respectivamente em 36% e 46% dos caramujos recém-nascidos analisados após o período de quatro meses de introdução. Por outro lado, no córrego São José do Retiro, área de alta densidade populacional da linhagem local, o marcador molecular de 350pb foi detectado apenas em 3% de recém-nascidos. Os experimentos realizados no campo por Rosa (2008) apresentaram resultados iniciais promissores, entretanto os dados obtidos foram referentes apenas aos quatro meses pós-introdução não sendo possível inferir se o material genético da linhagem resistente *B. tenagophila* do Taim transmitido aos caramujos locais fosse capaz de se estabelecer por um longo período de tempo e se esta transferência afetaria a suscetibilidade dos caramujos pós-intervenção.

Com o intuito de dar continuidade a este experimento, em maio de 2010, após dois anos de realização desta intervenção foi realizado um novo monitoramento das áreas anteriormente testadas por Rosa (2008) que compreendem os córregos Santa Inês, Lava Pés e São José do Retiro. Foram capturados 159 caramujos no córrego da chácara Santa Inês, seis no córrego Lava Pés e nenhum no córrego São José do Retiro. O baixo número de caramujos capturados nestas duas últimas áreas, provavelmente deve-se à descaracterização do ambiente, principalmente por impactos antrópicos tais como aterramentos, desvios, lançamento de esgoto doméstico e acúmulo de lixo que podem estar interferindo na dinâmica populacional destes moluscos. Entretanto o marcador molecular típico da linhagem do Taim estava presente apenas em 10% dos caramujos coletados no córrego Santa Inês. Estes resultados indicam que mesmo após dois anos sem intervenção, há continuidade da inserção do patrimônio genético

de *B. tenagophila* do Taim nos caramujos locais deste córrego, embora em proporções menores que na época da introdução. Como parte destas áreas sofreram modificações ao longo destes dois anos, ficou estabelecido que o modelo fosse testado em uma nova coleção hídrica.

Devido à relevância desta proposta novas introduções devem ser realizadas com o intuito de obter mais esclarecimentos sobre este modelo. A compreensão das diferentes variáveis que interferem nos resultados será fundamental para delinear futuras intervenções e fornecer uma análise mais completa sobre a eficiência deste modelo. Vale ressaltar a importância desta proposta no que se refere na possibilidade de se identificar e clonar o gene da resistência abrindo precedentes para aplicação deste modelo em áreas de transmissão mantida por outras espécies, principalmente por *B. glabrata*.

2 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista que os hospedeiros intermediários do gênero *Biomphalaria*, constituem um elo vital para a manutenção do ciclo evolutivo do *Schistosoma mansoni* e que o seu controle é uma tarefa difícil de ser realizada, devido a sua notável capacidade de proliferação e plasticidade adaptativa, justificam-se a busca de conhecimentos da interação do parasito com os hospedeiros intermediários que poderão fornecer subsídios para o desenvolvimento de novas estratégias de controle.

O presente projeto faz parte de uma linha de pesquisa promissora desenvolvida por um grupo de pesquisadores, pertencentes ao Centro de Pesquisas René Rachou – CPqRR/FIOCRUZ, Instituto de Ciências Biológicas – ICB/UFMG e com a Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN) do Estado de São Paulo que consiste na introdução da linhagem resistente *B. tenagophila* do Taim em áreas onde *B. tenagophila* seja a única espécie transmissora. Esse modelo pode representar uma alternativa para o controle da transmissão da esquistossomose em determinadas áreas do Estado de São Paulo, já que a maior parte dos casos autóctones de esquistossomose, diagnosticados em território paulista, resulta dos contatos com ambientes hídricos colonizados por *B. tenagophila*.

Um dos motivos da escolha do Município de Bananal/SP foi à existência de um trabalho prévio de controle da esquistossomose muito bem feito nos anos de 1998 a 2001 com um minucioso estudo epidemiológico constando também do levantamento malacológico da região realizado por Teles *et al*, (2002).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar se a linhagem *B. tenagophila* do Taim, resistente ao *S. mansoni*, introduzida em áreas com presença de *B. tenagophila* suscetível a este trematódeo, está transmitindo o caráter da resistência aos caramujos locais após sua introdução.

3.2 Objetivos Específicos

- Pesquisar novas áreas no Município de Bananal-SP para testar o modelo de controle biológico da transmissão da esquistossomose.
- Ampliar a criação em larga escala de *B. tenagophila* do Taim, estabelecida desde 2005.
- Introduzir a linhagem *B. tenagophila* do Taim, resistente ao *S. mansoni*, nas áreas selecionadas.
- Analisar através da técnica PCR_RFLP a percentagem do marcador molecular de 350 pb, típico da linhagem do Taim, presente nos caramujos com diâmetro inferior a 5mm coletados 4, 11 e 14 meses após a introdução.
- Avaliar a suscetibilidade dos descendentes F1 de caramujos locais após a introdução de exemplares resistentes (população Taim).
- Verificar a proporção do marcador molecular de 350pb nos descendentes F1 submetidos aos testes de infecção.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área de Estudo

O estudo foi realizado em uma coleção hídrica no Município de Bananal, São Paulo. Este e outros quatro municípios (Areias, Silveiras, São José do Barreiro e Arapeí) compreendem uma microrregião também denominada Bananal pertencentes à mesorregião Vale do Paraíba Paulista. O Município de Bananal localiza-se mais á leste do Estado onde se situa entre os Municípios fluminenses Barra Mansa (ao norte), Rio Claro (a leste) e Angra dos Reis (ao sul), além dos Municípios paulistas (a oeste) São José do Barreiro e Arapeí (Figura 3). Os principais acessos são pela Rodovia Presidente Dutra (BR- 116), Rodovia dos Tropeiros (SP-068), Rodovia Resgate (SP-064) e Estrada da Bocaina (SP-247).

O Município abrange 618, 7Km² sendo estimada uma população de 10 220 habitantes (16,5 hab./ Km²) (IBGE, 2011). A população urbana distribui-se às margens de um rio principal denominado Bananal que corta a cidade passando pelos bairros: Niterói, Laranjeiras, Cerâmica, Três Barras, Palha, Centro e Vila Bom Jardim, sendo os dois últimos mais densos. A rede hidrográfica de Bananal é extensa e faz parte da Bacia do Médio Vale do Paraíba. O rio Bananal, que é um afluente do rio Paraíba do Sul, escoa a água dos seguintes tributários Paca Grande, Braço, Turvo, Pirapitinga, Manso, Vermelho, Carioca, Prata, Pilões, Lava-Pés e Bocaina (Teles, 2006).



Figura 3: Principais acessos rodoviários de Bananal, São Paulo, Brasil e proximidade com municípios vizinhos.

4.2 Seleção de coleções hídricas para introdução

A primeira etapa do presente trabalho foi realizar um levantamento malacológico em córregos do Município de Bananal/SP (Figura 4).



Figura 4: Fotografias retiradas durante a realização do levantamento malacológico em córregos do município de Bananal/SP. Sendo: A e B) Procedimentos de coleta C) caramujos retirados com o auxílio do coletador (Pá de Zé Miguel). D) caramujos encontrados associados à vegetação.

Os caramujos foram coletados com uma pá de captura composta de uma armação de metal dotada de tela com malha de 2 mm e área aproximada de 300 cm², fixada em um cabo de madeira (Pá de Zé Miguel). A coleta de caramujo foi realizada por quatro pessoas e o tempo de coleta e o número de conchadas não foi estimado. A técnica de captura de moluscos consiste em raspar com a concha, a vegetação submersa, as margens e o fundo dos criadouros. Os caramujos capturados foram retirados das pás com o auxílio de uma pinça e transferidos para recipientes plásticos ou cubas devidamente identificadas. Em função da correnteza, para

não perder exemplares durante a coleta, ficou estabelecido que a mesma fosse realizada da Foz do córrego até a o local da introdução. Os moluscos coletados foram acondicionados e transportados para o laboratório de esquistossomose do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ de acordo com a técnica descrita no manual de diretrizes técnicas elaborado pelo Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose (Brasil, 2008).

O GPS (Sistema de Posicionamento Global), modelo Garmin GPSmap 60CSx foi utilizado para identificar a localização da área estudada. Além disso, foram coletados dados pluviométricos durante todo o período de intervenção. Estes dados foram fornecidos por Jorge Gonçalves Coelho, funcionário da CTH (serviço de hidrografia) do Departamento de águas e Energia Elétrica de Bananal.

4.3 Exame Parasitológico

No laboratório os moluscos coletados durante todo o experimento foram colocados individualmente em pequenos béqueres com pouco de água desclorada com temperatura próxima de 26°C. Em seguida os recipientes foram expostos à luz artificial (lâmpadas incandescentes) por aproximadamente 4 horas (Pellegrino & Macedo, 1955). Este procedimento fornece condições ideais de temperatura e luminosidade para eliminação de cercárias de moluscos possivelmente infectados. Os moluscos foram examinados por um período de 60 dias, com exames semanais.

4.4 Identificação de moluscos

Cinco exemplares coletados foram encaminhados para o Laboratório de Referência em Esquistossomose do CPqRR para identificação molecular específica de acordo com a técnica descrita por Vidigal *et al*, (2000).

4.5 Obtenção de moluscos para os testes de infecção pelo *S. mansoni*

Moluscos, coletados antes e após a introdução, foram mantidos no laboratório para coleta de desovas visando testes de suscetibilidade ao *S. mansoni*. A criação dos moluscos coletados no campo em condições de laboratório, bem como a obtenção de desovas foram realizados de acordo com as técnicas utilizadas na rotina do Moluscário Lobato Paraense do CPqRR descritas por Jannotti-Passos *et al*, (2008) com algumas modificações. Os moluscos provenientes do campo foram colocados em cubas com água desclorada acrescidas de terra peneirada que foi esterilizada e enriquecida com carbonato de cálcio 10%. As cubas foram teladas e tampadas para evitar a saída dos moluscos e a proliferação de insetos. A água foi trocada pelo menos duas vezes por semana e a alimentação basicamente constituída de alface fresca lavada em água corrente, além da ração padronizada por Freitas (1973) que foi

fornecida de acordo com a necessidade dos moluscos. A temperatura da sala de criação foi monitorada. No caso das desovas, o procedimento foi o mesmo, alterando apenas a quantidade de ração fornecida.

Pedaços de plástico transparente foram colocados sobre a superfície da água para coleta de desovas. Quando repletos de desovas os mesmos foram transferidos para uma nova cuba. Após a eclosão, os caramujos foram mantidos até alcançarem 6 à 8 mm de diâmetro, tamanho utilizado para infecção. O tempo de crescimento dos caramujos nestas condições foi de aproximadamente 3 a 4 meses.

4.6 Ampliação da criação em larga escala de *B. tenagophila* do Taim

4.6.1 Local e montagem dos tanques

Com o objetivo de introduzir *B. tenagophila* Taim em áreas endêmicas onde esta seja a principal espécie transmissora, estabeleceu-se uma criação em larga escala na Chácara Santa Inês - Vila Bom Jardim – Bananal - São Paulo. Durante o período de 2005- 2009, os moluscos foram criados com êxito num antigo galpão. A partir de 2010 foi concebida uma nova instalação para criação em larga escala, maior e melhor adaptada para a finalidade de criação de *Biomphalaria*. O espaço a atual é constituído de quatro grandes tanques de alvenaria com dimensões de 9,4 metros de comprimento por 0,2 metros de profundidade e 0,6 metros de largura e capacidade de 1240 litros (Figura 16 A e B). O fundo de cada tanque foi recoberto por uma camada de terra vermelha esterilizada por duas horas em forno com temperatura de cerca de 150 °C acrescida com 10% de carbonato de cálcio. Todos os tanques contêm um cano de PVC com 0,2 metros de altura com topo telado, funcionando como dreno para troca de água. No fundo do tanque existe um tampão que pode ser removido, facilitando o escoamento da água durante o processo periódico de limpeza. Para evitar que fêmeas de culicídeos realizassem a postura de ovos dentro dos tanques como também a fuga dos moluscos, foi acrescentada uma tampa que consiste de uma tela fixada em quatro ripas de madeira 3m x 0,60m com duas dobradiças na parte lateral superior. As tampas são abertas através de um sistema móvel constituído por uma corda de *nylon* que quando puxada, com o auxílio de uma roldana presa no teto, faz a elevação da tampa em ângulo de 90° e esta permanece fixada em sua própria estrutura. Este sistema móvel com tampas foi criado para facilitar o manejo (Figura 5C).

A temperatura dos tanques é controlada através de painéis constituídos de lonas (preta na parte externa e branca na parte interna) usadas em galpões para criação de frangos. Estes painéis ficam recolhidos durante os meses mais quentes e no inverno são abaixados de forma

que toda área do tanque fique protegida. Estas lonas conservam e concentram o calor dos raios solares por efeito estufa propiciando o ajuste da temperatura da água dos tanques entre 20 a 24°C. Estes painéis são muito importantes principalmente nos meses mais frios para manter o rendimento da criação. Há dois tipos de iluminação: uma natural quando os painéis estão levantados, pois os tanques recebem iluminação direta dos raios solares e outra, artificial com uso de lâmpadas fluorescentes principalmente quando os painéis estão abaixados no período do inverno ou à noite quando necessário.

A água que abastece os tanques vem diretamente de uma nascente local. O pH da água é de aproximadamente 7,0 e esta circula pelos tanques diariamente. As torneiras que abastecem os tanques são teladas para evitar a entrada de outros organismos tais como sanguessugas, outros moluscos, larvas de insetos etc, que possam vir com a água e comprometer a criação.

4.6.2 Criação e alimentação

Exemplares de *B. tenagophila* do Taim resistentes ao *S. mansoni* foram coletados na Estação Ecológica do Taim no Rio Grande do Sul em 1979. Desde então vem sendo mantidos no moluscário do Laboratório de Esquistossomose do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG. A colônia utilizada para a ampliação da criação procedeu da antiga criação. Para dar início à criação em 2010, caramujos foram distribuídos em um único tanque de alvenaria e placas de isopor de 15 cm foram colocadas na superfície da água para o depósito das desovas. As placas repletas de desovas foram transferidas para um novo tanque “berçário”, local no qual ocorre a eclosão das desovas e criação de recém-nascidos. Ao alcançarem 4 a 5mm de diâmetro os caramujos foram transferidos do berçário para os tanques de criação.

Nestas novas instalações, as condições de alimentação foram mantidas de acordo com o estabelecido em 2005 para a antiga criação. A dieta dos caramujos foi semelhante à utilizada no moluscário do laboratório de esquistossomose ICB_UFMG e consiste em folhas de alface fresca e ração (Figura 6D). A ração de caramujo foi a padronizada por FREITAS e é composta por 1 kg de alfafa, 1 kg de ração de camundongo, 500 g de germe de trigo, 300 g de carbonato de cálcio, 300 mg de vitamina E e 100 g de leite em pó. Foi padronizado que cada tanque conteria em média 3000 exemplares e receberia diariamente 35.000 mg de ração, enquanto no tanque berçário seria colocado 25.000 mg da mesma ração, uma semana antes da eclosão, para a formação de uma camada de algas e fungos. Esta é a principal fonte nutricional para os caramujos recém-eclodidos. Para fortalecer as conchas dos caramujos foram adicionados 20 g de carbonato de cálcio, a cada 15 dias em cada tanque.



Figura 5: Fotografias do novo espaço destinado para criação em larga escala de *B. tenagophila* do Taim localizada na chácara Santa Inês, Bananal/SP. Sendo: A) vista externa da área cedida pelo Dr. Engels Maciel para nova criação; B) vista interna mostrando os tanques de alvenaria da criação; C) Demonstração do sistema de abertura dos tanques e o sistema de iluminação da nova criação; D) Fotografia que demonstra a distribuição de alface e ração.

4.7 Introdução da linhagem *B. tenagophila* do Taim/RS

O estabelecimento bem sucedido da criação em larga escala de *B. tenagophila* do Taim desde 2005, localizado na chácara Santa Inês, em Bananal e sua ampliação em 2010 possibilitou a utilização de um grande número de caramujos para a nova introdução. Em julho de 2010, 800 moluscos com aproximadamente 9 a 12 mm de diâmetro foram selecionados dos tanques de criação e os mesmos receberam uma marcação física que consiste em um furo pequeno de apenas 1mm de diâmetro na parte lateral e próxima da abertura superior da concha, onde deve ser perpassado um fio de nylon que depois de um nó forma um pequeno anel (Figura 6).



Figura 6: Técnica de marcação física das conchas de *B. tenagophila*. (Fonte: Coelho *et al.*, 1986)

Após a marcação, estes moluscos foram acondicionados em uma cuba de plástico e organizados em camadas de papel toalha umedecido contendo 50 caramujos por camada. Os 800 exemplares de *B. tenagophila* do Taim foram introduzidos na sessão superior (cabeceira) do córrego selecionado para este estudo, já que a correnteza da água possibilita a sua dispersão ao longo do córrego (Figura 7).

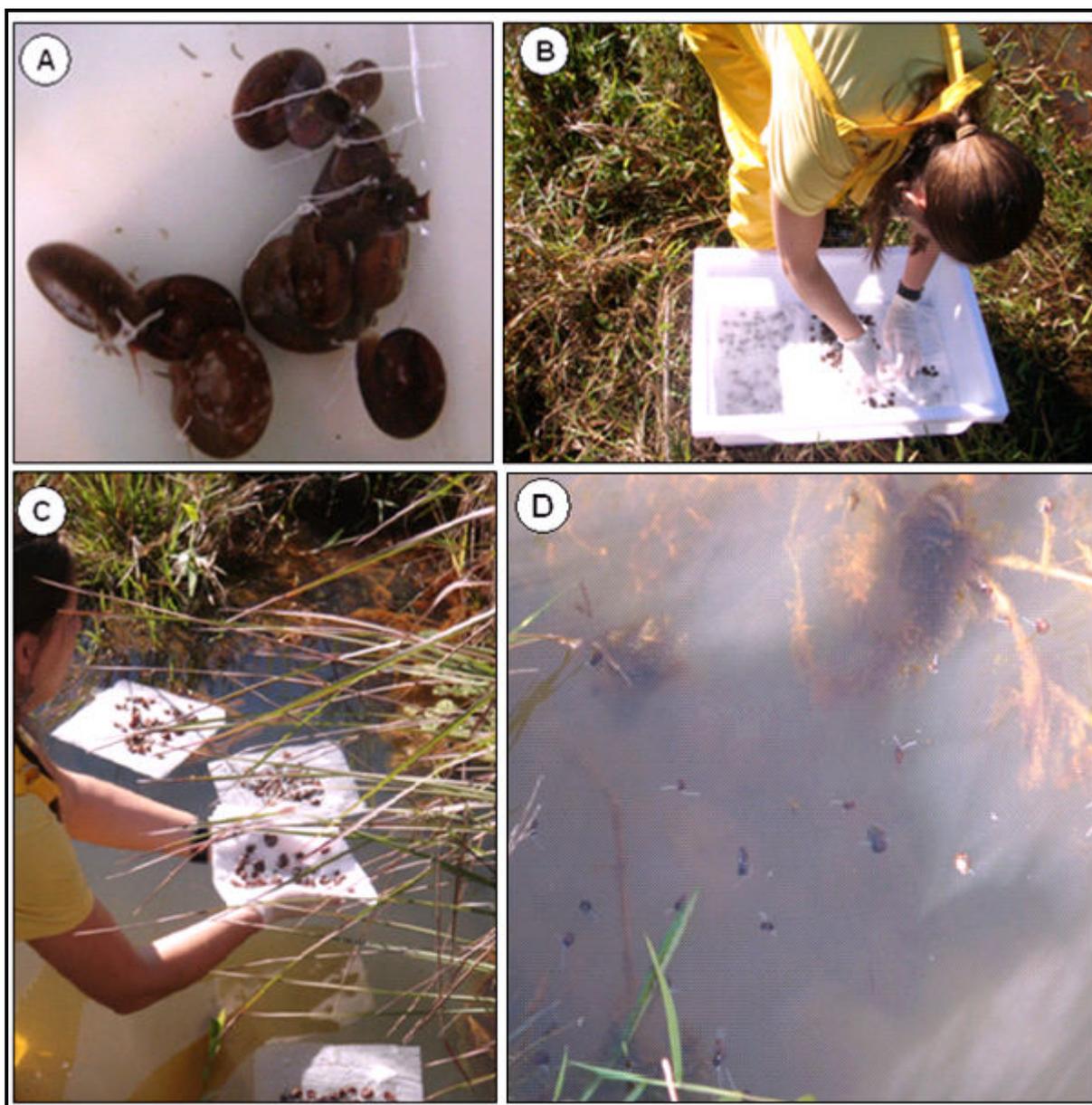


Figura 7: Introdução da linhagem *B. tenagophila* do Taim no córrego selecionado. Sendo: **A)** exemplares *B. tenagophila* do Taim marcados; **B)** fotografia demonstrando os caramujos marcados organizados em camadas na cuba de plástico; **C e D)** Introdução de exemplares da linhagem *B. tenagophila* do Taim no córrego Herivelton Martins.

4.8 Estimativa da população *B. tenagophila* após 15 dias da introdução

Uma avaliação da capacidade de dispersão da linhagem introduzida e estimativa da população local foi realizada 15 dias após as introduções de acordo com a técnica descrita por Coelho *et al*, 1986. Neste caso, foi realizada uma coleta minuciosa no local onde ocorreu a introdução, identificando e contando os exemplares marcados e não marcados.

A partir destes dados foi possível estimar, por regra de três simples, o número total de caramujos, a densidade populacional dos marcados em relação aos caramujos locais não

.marcados e prever a proporção dos introduzidos em relação à população local e a estimativa da densidade populacional desta última. (Figura 8).

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

A= Total de caramujos capturados, marcados e não marcados.
B= Total de caramujos recapturados, marcados.
C= Total de caramujos marcados introduzidos no habitat logo após a marcação.

Figura 8: Fórmula utilizada para estimar a densidade populacional dos moluscos após a introdução no campo, descrita por Coelho *et al.*, 1986 (Fonte: Rosa, 2008).

4.9 Monitoramento

Após 4, 11 e 14 meses da introdução da linhagem resistente *B. tenagophila* do Taim no córrego selecionado, o maior número possível de caramujos inferiores ou igual a 5 mm de diâmetro foram coletados, descendentes de cruzamentos recentes. Este procedimento foi realizado a fim de verificar se o patrimônio genético da linhagem resistente ao *S. mansoni* foi transmitido aos caramujos locais. Em seguida, todos os exemplares vivos coletados foram mensurados, contados, identificados, acondicionados para transporte e enviados ao Laboratório de esquistossomose do CPqRR/FIOCRUZ. No laboratório, os caramujos foram mantidos de acordo com a técnica descrita na sessão 4.5 sendo posteriormente submetidos aos testes parasitológicos e análises moleculares. Os testes de suscetibilidade foram realizados com os descendentes F1 obtidos de cada área.

4.9.1 Exame parasitológico

Todos os caramujos coletados no campo nos diferentes períodos foram submetidos ao exame parasitológico semanalmente por um período 60 dias, para verificar a eliminação natural de cercárias de *S. mansoni* e/ou de outros trematódeos seguindo-se a técnica de Pellegrino & Macedo (1955), já descrita na sessão 4.3. Quando os caramujos estavam eliminando algum tipo de cercárias, estas eram coletadas e transferidas para tubos tipo eppendorf. Os exemplares coletados no campo que estavam positivos e suas respectivas cercárias foram criopreservados, separadamente, para serem submetidos às análises moleculares.

4.9.2 Análises moleculares

Após a retirada de desovas e exame parasitológico, parte dos moluscos, coletados após a intervenção no campo, foi submetida à técnica PCR-RFLP para detectar a presença do marcador molecular de 350pb típico de *B. tenagophila* do Taim, bem como verificar as proporções do marcador molecular nos caramujos sobreviventes que foram submetidos aos testes de suscetibilidade.

Por sugestão da Dra. Roberta Caldeira (LHMM/CPqRR) um *pool* de cada tipo de cercárias: *S.mansoni*, cercária caratinguensis e Xiphidocercárias, como também espécimes de *B. tenagophila* infectados por estes trematódeos foram submetidos à extração de DNA e PCR_RFLP objetivando comparar o perfil de restrição destas cercárias com o perfil típico da linhagem *B. tenagophila* do Taim, além de detectar possível infecção dos moluscos.

4.9.2.1 Extração e dosagem de DNA

O DNA total dos moluscos foi extraído usando o Kit Wizard Genomic (Promega) seguindo-se as normas do fabricante e modificações sugeridas por Vidigal *et al*, (2000a). Para isso, a região cefalopodal de cada caramujo foi retirada de acordo com a técnica descrita por Paraense (1976), salvo algumas modificações (Figura 9). Com o auxílio de uma peneira os caramujos foram imersos em água a 70° C por um período de 30 a 45 segundos (dependo do tamanho do exemplar) e posteriormente mergulhados em água fria. Segurados pela concha, o corpo de cada exemplar foi retirado com uma pinça e posteriormente realizada a separação da região cefalopodal com o auxílio de um bisturi. A região cefalopodal foi colocada em um tubo tipo eppendorf Axigen (1,5ml) devidamente identificado. A este material foram adicionados 200µl da solução de lise nuclear que foi incubado a 37° C por um período de 12 horas com 50µg/ml de proteinase K. Depois, 80 µl de solução de precipitação proteica foram adicionados ao tubo inicial. O material foi previamente agitado usando o vortex por 20 a 30 segundos e logo em seguida centrifugado a 13000 rpm por 3min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo contendo 200 µl de isopropanol para precipitar o DNA. Este material foi homogeneizado por inversão durante 20 min e depois centrifugado a 13000rpm por 6 min. O sobrenadante foi desprezado e ao pellet de DNA adicionado 500µl de etanol 100% (gelado) e 10% de solução de acetato de sódio 3M pH 5,2. Este material permaneceu incubado a -70^a C por 2 horas e depois centrifugado por 10min a 13000rpm. O sobrenadante foi desprezado e 500µl de etanol 70% (gelado) foi adicionado ao pellet de DNA, e este novamente centrifugado. Finalmente, após a evaporação completa do etanol foi acrescentado ao pellet de DNA 25µl de solução de reidratação que foi incubado a 37° C por 30 minutos e

estocado a -20°C . O protocolo utilizado para a extração de DNA de cercárias foi o mesmo, exceto o volume da solução de reidratação que foi reduzido para $10\mu\text{l}$.

Após a extração de DNA, as amostras foram dosadas em gel de agarose a 1%, o sistema utilizado foi o de minigel. Foi aplicado na primeira canaleta $1\mu\text{l}$ do padrão de quantificação de DNA (Low DNA Mass Ladder- Promega) e nas demais canaletas $3\mu\text{l}$ de cada amostra de DNA misturados a $1\mu\text{l}$ de Blue Green que além de corar o gel já atua como tampão de amostra.

O gel foi submetido a uma corrente de 80 volts, por aproximadamente 50 min em tampão de corrida TBE (0,89M de Tris, 0,02M de EDTA e 0,89M de Ácido bórico). Após a corrida, o gel foi examinado sob luz ultravioleta e as concentrações das amostras de DNA estimadas pela comparação com o padrão de quantificação.

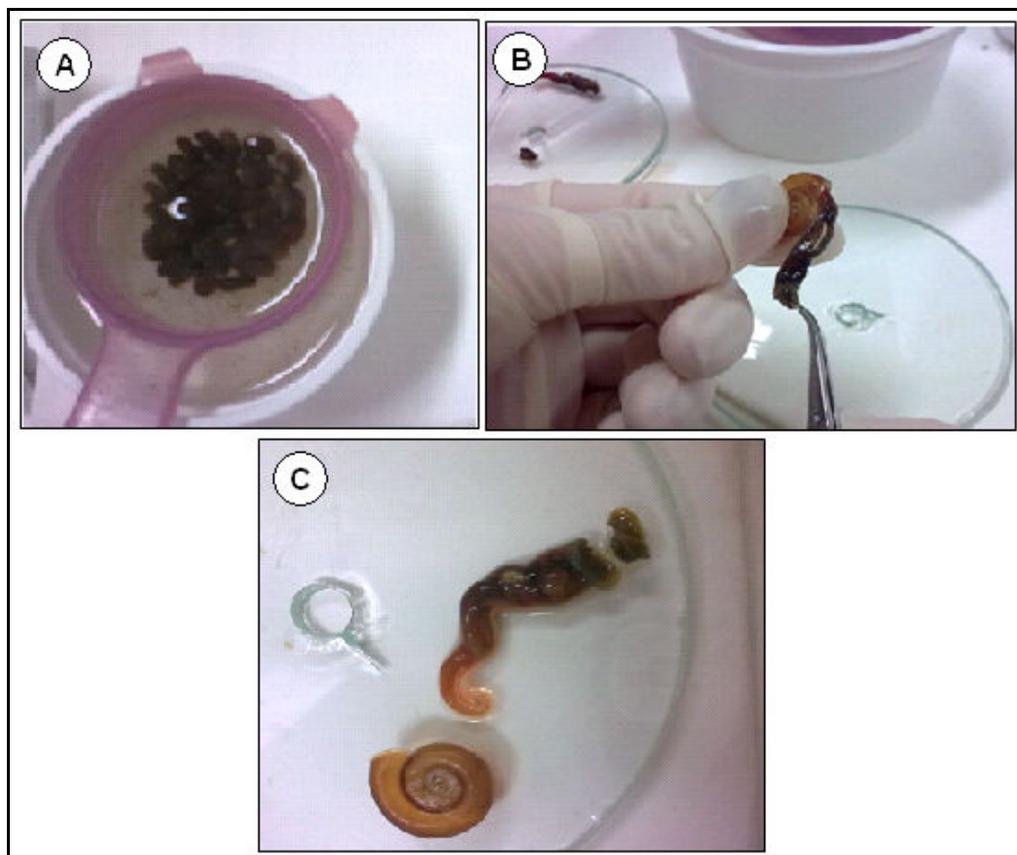


Figura 9: Técnica utilizada para seccionar partes de *B. tenagophila*. Sendo: **A)** Caramujos mergulhados em água fria após imersão em água a 70°C . **B)** Retirada do corpo do caramujo com auxílio da pinça e **C)** Corte da região cefalopodal do caramujo.

4.9.2.2 Protocolo da PCR_RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism-Polimerase Chain Reaction)

O DNA extraído dos caramujos foi submetido à técnica de PCR conforme descrito por Vidigal *et al.*, (2000a). Os iniciadores foram utilizados para amplificação da região espaçadora transcrita interna do rDNA (Figura 10). A reação foi preparada em tubos tipo eppendorf livre de RNase e DNase de 0,6ml (Axigen) contendo aproximadamente 1 a 10 ng de DNA alvo juntamente com 200µM de cada um dos desoxirribonucleotídeos trifosfatos, 1,5 mM de MgCl₂, 0,8 unidade da Taq DNA polimerase, 50 pmoles de cada iniciador (ETTS1 e ETTS2), tampão de PCR (50mM de KCl, 10mM de Tris-HCl pH 8,5) em um volume final de 10µl ajustado pela adição de água estéril. Todos os reagentes utilizados na PCR foram fornecidos pela Invitrogen, exceto os iniciadores ETTS2 (5'-TAACAAGGTTTCCGTAGGTGAA-3') e ETTS1 (5'-TGCTTAAGTTCAGCGGGT-3') (Kane & Rollison, 1994) que foram produzidos pela Ludwing Brasil. Foi incluída uma amostra de controle negativo em todas as reações, contendo todos os reagentes na ausência do DNA alvo. As condições de amplificação utilizadas foram: desnaturação por 3 min à temperatura de 95° C, seguida de 32 ciclos de anelamento de 1 min a 54°C, extensão por 2 min a 72° C, desnaturação por 45 s a 95° C e finalmente extensão durante 5 min a 72° C. Os produtos amplificados foram estocados a - 20° C.

O fragmento obtido com os iniciadores ETTS1 e ETTS2, de aproximadamente 1.300 pb, foi submetido à restrição com a enzima *DdeI* (Invitrogen). Para isto o restante do material amplificado (7µl) foi diluído de acordo com a intensidade do perfil de bandas produzido a partir da PCR específica. Para a digestão foram utilizados 10 µl do produto de PCR diluído, 0,3 µl (4-8 unidades) da enzima *DdeI* e 1 µl do tampão da enzima fornecido pelo fabricante. O volume final da reação foi de 11,3 µl e a digestão foi realizada em um termociclador por 03h30min h à 37°C seguida por um ciclo de 20 minutos à 80°C.

Após as reações, 3µl dos produtos de cada amplificação foram adicionados a 3µl de tampão de amostra 2X (0,125% de azul bromofenol, 0,125% de xilenocianol, e 15% de ficol) e submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, em tampão de corrida TBE 1X, usando-se o sistema de mini-gel (BIO-RAD). Os géis foram submetidos a uma corrente de 80 volts por aproximadamente 90 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, esses géis foram corados pela prata, de acordo com o protocolo descrito por Sanguinetti *et al.*, (1994) para visualização dos fragmentos de interesse. O tamanho das bandas foi determinado por comparação com um padrão de peso molecular (phiX-174). Vale ressaltar que foram feitos

géis tanto para confirmação da amplificação do fragmento de 1300pb quanto para visualização dos produtos da digestão.

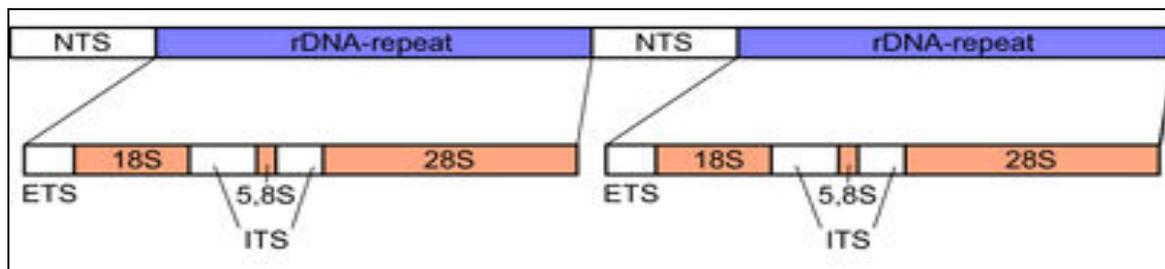


Figura 50: Esquema do gene codificador do RNA ribossomal. Sendo: (NTS) Espaçador não transcrito (ETS) espaçador transcrito externo, duas subunidades conhecidas (SSUs-18S e 28S), um rRNA (5.8 S) entre dois espaçadores internos transcritos (ITS1, ancorado na região 5.8S). (Fonte: http://www.absoluteastronomy.com/topics/Ribosomal_DNA. Acesso em : 2010).

4.9.3 Testes de infecção

4.9.3.1 Parasito

A cepa do parasito utilizada em todos os testes de suscetibilidade do presente estudo foi a SJ de *S.mansoni*. Esta foi isolada em 1960 de *B. tenagophila* originários de São José dos Campos/SP, vale do Rio Paraíba, sendo mantida através de infecções em hamsters e *B. tenagophila*, com passagens esporádicas em *B. glabrata*. A cepa do parasito foi fornecida pelo Moluscário Lobato Paraense/CPqRR que mantém linhagem a mais de 40 anos conforme a técnica descrita por Pellegrino & Katz (1968).

4.9.3.2 Grupos experimentais dos testes de infecção

Para avaliar o efeito da introdução da linhagem resistente sobre a suscetibilidade dos caramujos locais, descendentes F1 com aproximadamente 6 a 8 mm de diâmetro foram submetidos a três desafios com a cepa SJ de *S. mansoni*.

No primeiro desafio, 70 exemplares (coletados antes da intervenção) e 70 exemplares (coletados após 4 meses da intervenção) e 70 exemplares de *B. glabrata* (grupo controle) foram desafiados individualmente com aproximadamente 25 miracídios da cepa SJ de *S. mansoni*.

O segundo foi constituído por 50 caramujos (coletados antes da introdução), 50 caramujos (coletados após 4 meses da introdução) 50 caramujos (coletados após 11 meses da introdução) e 50 exemplares de *B. glabrata* (grupo controle). Estes grupos foram expostos à mesma carga parasitária utilizada no primeiro experimento.

O terceiro desafio foi composto por 50 caramujos (coletados antes da introdução), 50 caramujos (coletados após 11 meses da introdução) 50 caramujos (coletados após 14 meses da introdução) e 50 exemplares de *B. glabrata* (grupo controle). Todos os grupos foram expostos a uma média de 25 miracídios. Neste último desafio, os caramujos coletados após 4 meses da introdução não foram incluídos devido a ausência de um número suficiente de exemplares no tamanho definido para infecção (Tabela 1).

Tabela 1: Grupos experimentais utilizados nos desafios realizados com a cepa SJ de *S. mansoni*

Teste	Espécie/ localidade	Período da coleta	Número de caramujos expostos à cepa SJ
1º	<i>B. tenagophila</i>	Antes da introdução	70
		4 meses após a introdução	70
	<i>B. glabrata</i> (BH) Controle positivo	*	70
2º	<i>B. tenagophila</i>	Antes da introdução	50
		4 meses após a introdução	50
		11 meses após a introdução	50
	<i>B. glabrata</i> (BH) Controle positivo	*	50
3º	<i>B. tenagophila</i>	Antes da introdução	50
		11 meses após a introdução	50
		14 meses após a introdução	50
	<i>B. glabrata</i> (BH) Controle positivo	*	50
Total de caramujos			610

*Exemplares fornecidos pelo Moluscário Dr. Lobato Parence (CPqRR) no dia de cada infecção.

4.9.3.4 Protocolo de infecção

Antes da infecção os caramujos foram retirados das cubas de criação para a realização e o diâmetro das suas conchas foram medidas por meio de uma régua que consiste numa tela de plástico de fundo quadriculado, na qual estavam desenhados os círculos de diâmetros entre 2 a 36 mm. Os caramujos que mediam entre 6 a 8 mm de diâmetro foram selecionados e posteriormente expostos individualmente com aproximadamente 25 miracídios.

Os ovos de *S. mansoni* foram obtidos a partir de hamsters (*Mesocricetus auratus*) infectados experimentalmente com cercárias de *S. mansoni* e posteriormente sacrificados. Os fígados destes animais foram triturados no liquidificador juntamente com solução salina 0,85% de acordo com técnica descrita por Pellegrino & Katz (1968). A solução foi posteriormente transferida para um cálice, mantido no escuro por trinta minutos, e lavada várias vezes com água desclorada até limpar a solução. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento transferido para um balão volumétrico escuro com a extremidade superior clara, mantido a 28°C, sob luz artificial, até a eclosão dos ovos e liberação dos miracídios que aos poucos se concentram próximos à abertura do balão (Chaia, 1956).

A contagem dos miracídios procedeu-se da seguinte forma: os miracídios que haviam se concentrado à abertura do balão, foram transferidos para um béquer e com um auxílio de um microscópico estereoscópio foram contados. A média do número de miracídios foi estimada a partir de várias contagens. Em seguida, os miracídios foram transferidos para cada poço das placas de plástico transparentes com tampa (24 poços, utilizada para cultura de células) seguindo o seguinte padrão: os miracídios foram colocados primeiramente nos 4 poços da primeira linha de todas as placas. O material foi então examinado na lupa, a fim de se confirmar a presença, quantidade e motilidade dos miracídios. Posteriormente, os caramujos foram distribuídos nos poços das placas de seus respectivos grupos nos quais haviam sido colocados os miracídios. O volume de cada poço foi completado com água desclorada. Após este procedimento os miracídios foram colocados nos 4 poços da segunda linha, assim sucessivamente até que todos os poços de todas as placas fossem completados com o número de miracídios e caramujos utilizados em cada experimento (Figura 11). Os caramujos foram mantidos em contato com os miracídios por quatro horas, sob luz artificial (e transferidos para aquários com aeração constante e água corrente desclorada e aquecida a 27± 1°C, condições estas que são fundamentais para a penetração e desenvolvimento do parasito nos caramujos do gênero *Biomphalaria* em laboratório.

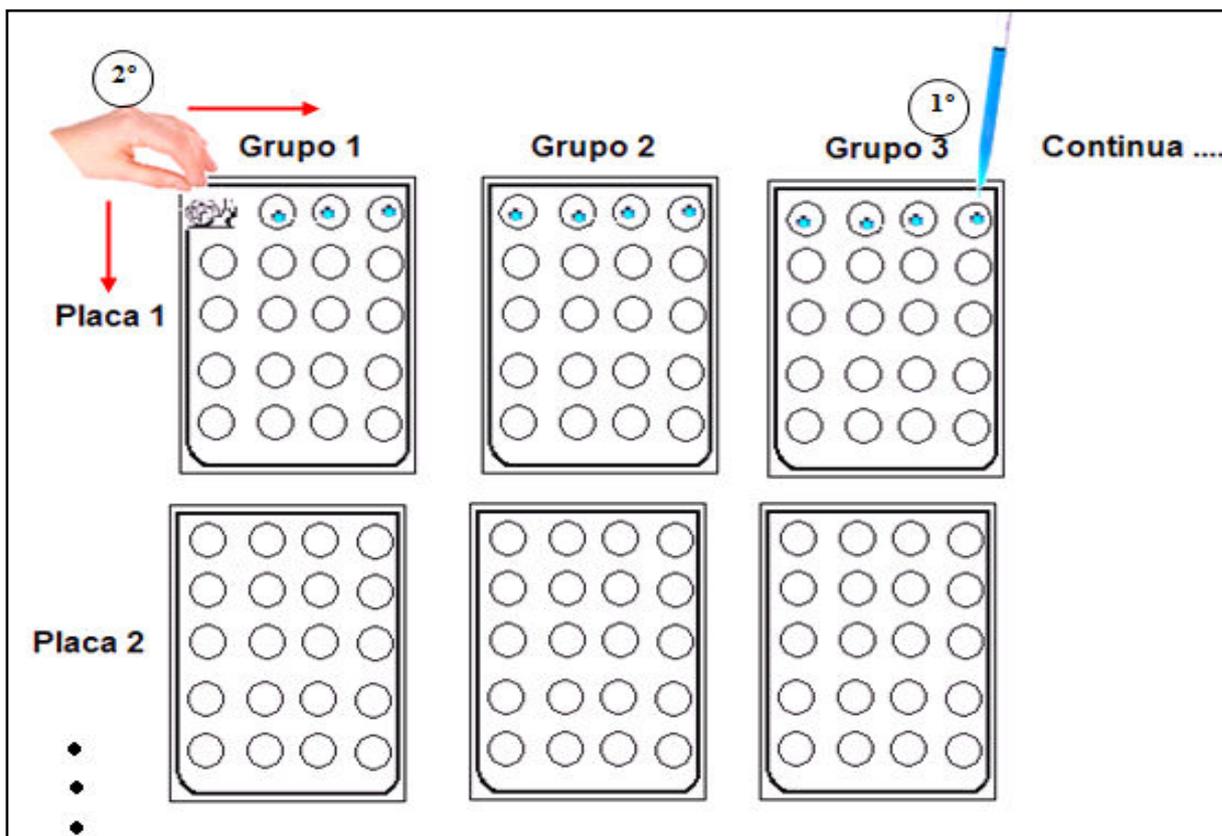


Figura 11: Metodologia utilizada nos testes de infecção. Sendo que: 1º refere-se à etapa de colocação dos miracídeos, com o auxílio de uma pipeta, em todos os poços da primeira linha da placa 1 de cada grupo. A palavra “continua” foi incluída para mostrar que o número de grupos depende de cada experimento. 2º refere-se à etapa de colocação dos caramujos de cada grupo nos poços em os miracídeos foram previamente colocados. As setas vermelhas indicam a sequência de colocação dos miracídeos e caramujos, ou seja, da esquerda para direita e de cima para baixo. Os três pontos indicam o número de placas a serem utilizadas que depende do número de exemplares a serem infectados em cada grupo.

4.9.3.5 Taxa de infecção

A verificação da positividade foi realizada através da eliminação de cercárias do parasito em caramujos expostos à luz artificial entre 26-60 dias após a exposição ao miracídio. O tempo de observação em até 60 dias foi devido ao fato que em *B. tenagophila*, o desenvolvimento do parasito no caramujo é um pouco mais lento. A taxa de mortalidade foi estimada semanalmente durante o período de 60 dias.

Foram realizados dois cálculos para taxa de infecção. No primeiro, a taxa de infecção foi calculada levando em conta número total de caramujos expostos e no segundo, o total de caramujos sobreviventes.

4.10 Análise Estatística

Para verificar possíveis associações ou diferença estatística entre os grupos analisados foi utilizado o teste Qui-quadrado de Pearson apropriado para comparação de proporções. Na presença de dados com baixas frequências, mais especificamente, menores que 5, foi utilizado o teste exato de Fisher. Em todas as análises foi considerado o nível de 5% de significância. Foram utilizados o *software* estatístico StatXact versão 6.0 e o Microsoft Office Excel 2007.

5 RESULTADOS

5.1 Seleção de novas coleções hídricas para introdução

O levantamento malacológico realizado em córregos localizados na região possibilitou a identificação de uma nova coleção hídrica para testar o modelo ora proposto. Esta nova coleção hídrica foi nomeada pelo grupo de córrego Herivelton Martins, pois situa-se em uma fazenda que pertenceu ao cantor e compositor brasileiro de mesmo nome. Este córrego está localizado no bairro Santo Antônio do Retiro, possui 42 metros de comprimento, em média 1,5m de largura e 0.6 m de profundidade. Há determinados trechos do córrego onde a profundidade pode alcançar valores de 1.5 metros (Figura 12). As coordenadas geográficas obtidas pelo GPS foram de 22°43'706''S (latitude) e 44°21'409''W (longitude), próximo ao local da introdução. Enquanto próximo da Foz, as coordenadas foram de 22°43'692''S e 44°21'400''W.

Este córrego apresentou as melhores características ecológicas para testar o modelo de controle biológico, por ser uma área mais isolada, dentro de uma propriedade particular no qual a probabilidade de impacto antrópico era reduzida.

Durante o levantamento malacológico foram coletados 137 caramujos neste córrego. Os mesmos foram encaminhados para o laboratório de esquistossomose do CPqRR onde foram mantidos para testes parasitológicos, moleculares e de suscetibilidade de acordo com as técnicas descritas nas sessões 4.3 e 4.5. Dos 137 exemplares coletados no córrego Herivelton Martins, nenhum dos caramujos eliminou cercárias de *S. mansoni* no período de 60 dias. Entretanto, 1 % e 2% dos caramujos coletados no córrego eliminaram cercária caratinguensis (Trematoda: Strigeidae) e Xiphidocercárias, respectivamente.

5.2 Identificação dos moluscos

A área selecionada para introdução da linhagem resistente *B. tenagophila* do Taim só foi definida após a emissão do laudo técnico pelo Serviço de Referência em Esquistossomose do CPqRR (com ênfase no exame e identificação de moluscos do gênero *Biomphalaria*) que confirmou a presença de *B. tenagophila*.



Figura 12: Fotografias do córrego Herivelton Martins, nova área escolhida para introdução da linhagem *B. tenagophila* do Taim demonstrando suas características físicas. **A)** poço localizado nas proximidades da Fóz do córrego e **B)** Poço principal

5.3 Dados pluviométricos

Durante a realização deste estudo foram coletados dados sobre a pluviometria no Município de Bananal/SP (Gráfico 1). Foi observado que durante o período de Abril a Agosto de 2010 a média do índice pluviométrico não ultrapassou 2 mm. A introdução da linhagem do Taim e sua recaptura 15 dias após a introdução foram realizadas nos meses de Junho e Julho respectivamente, coincidindo com o período em que foram registradas as menores médias. O período compreendido entre os meses de Agosto de 2010 a Março de 2011 apresentaram índices pluviométricos com média superior a 4 mm, com pico máximo em dezembro onde a

média alcançada foi de 14,9 mm. O período entre o mês de Abril a Outubro de 2011 apresentou uma média de 1,32 mm de chuva. Durante a realização do experimento no campo foi observada uma relação inversamente proporcional entre o índice pluviométrico e o número de caramujos coletados.

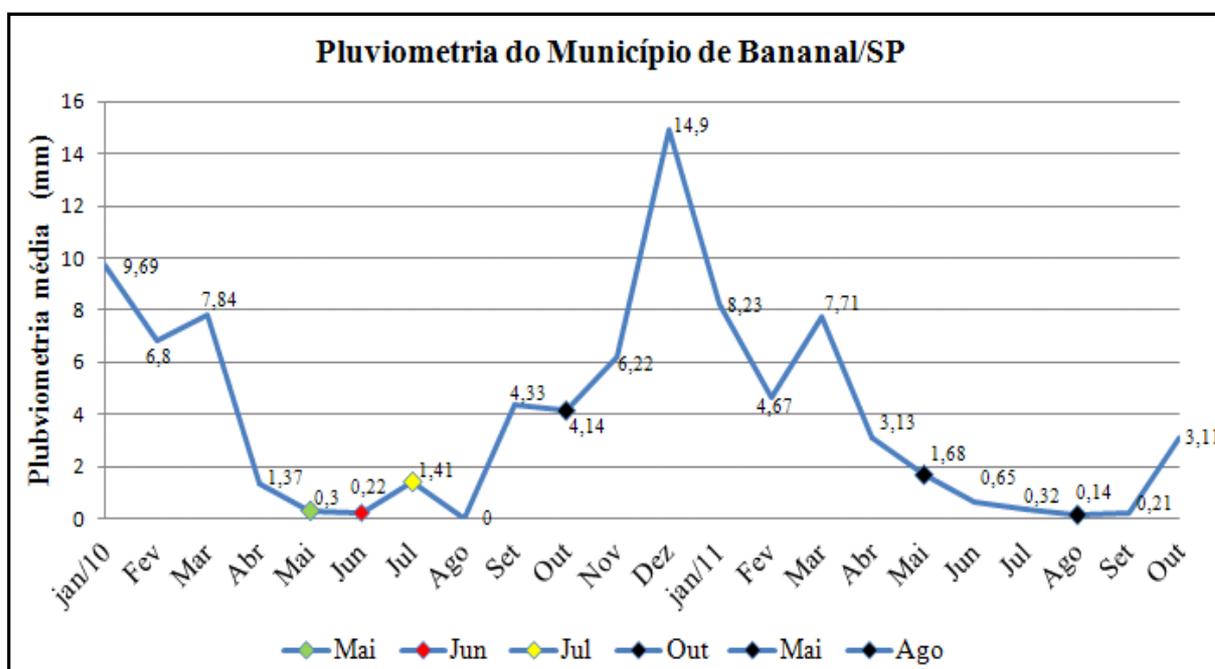


Gráfico 1: Dados pluviométricos de Bananal/SP de Jan/2010 a Out/2011. Sendo que o marcador verde indica o mês no qual foi feito o levantamento malacológico antes da introdução, o marcador vermelho indica o mês no qual ocorreu a introdução, o marcador amarelo indica o período no qual foi realizado a estimativa populacional da linhagem resistente introduzida e os demais marcadores (pretos) indicam as coletas realizadas após 4, 11, 14 meses da data de introdução (CTH/Departamento de Águas e Energia Elétrica de Banana/SP, 2011)

5.4 Criação de *B. tenagophila* do Taim em larga escala

Os dados referentes à criação em larga escala da linhagem do Taim encontram-se descritos no trabalho que foi aceito para publicação na Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (Anexo I).

5.5 Estimativa da população *B. tenagophila* introduzida

A densidade populacional da linhagem *B. tenagophila* local em relação à população introduzida foi estimada 15 dias após a intervenção, através de recaptura (Tabela 2). Foram recapturados 237 caramujos, estando 89 fisicamente marcados (linhagem do Taim) e 148 não

marcados (linhagem local). A população total foi estimada em 2130 indivíduos sendo que 37,5% correspondiam à população *B. tenagophila* do Taim.

Tabela 2: Estimativa da densidade populacional de *B. tenagophila* do Taim no córrego Herivelton Martins, 15 dias após a introdução.

Número de Taim marcados introduzidos	Total de caramujos capturados ($\geq 5\text{mm}$).	Número de caramujos marcados capturados	Número de caramujos locais capturados	População total estimada	% da população do Taim
800	237	89	148	2130	37.5

5.6 Monitoramento

O monitoramento no Córrego Herivelton Martins foi realizado após 4, 11 e 14 meses da data introdução. Durante a primeira coleta, conduzida após quatro meses da intervenção, foram coletados 443 jovens que mediam no máximo até 5mm de diâmetro. Após 11 meses de introdução foi realizada uma segunda coleta na qual foram capturados 117 caramujos. Durante a terceira coleta, ocorrida após 14 meses de introdução, foram coletados 213 caramujos. Durante os monitoramentos, ocorridos após a intervenção, foram coletados um total de 773 indivíduos (Tabela 3). Nenhum dos caramujos capturados e examinados após a intervenção estava eliminando cercárias de *S. mansoni*.

Tabela 3: Exemplos coletados após a introdução da linhagem do Taim, no córrego Herivelton Martins/Bananal-SP.

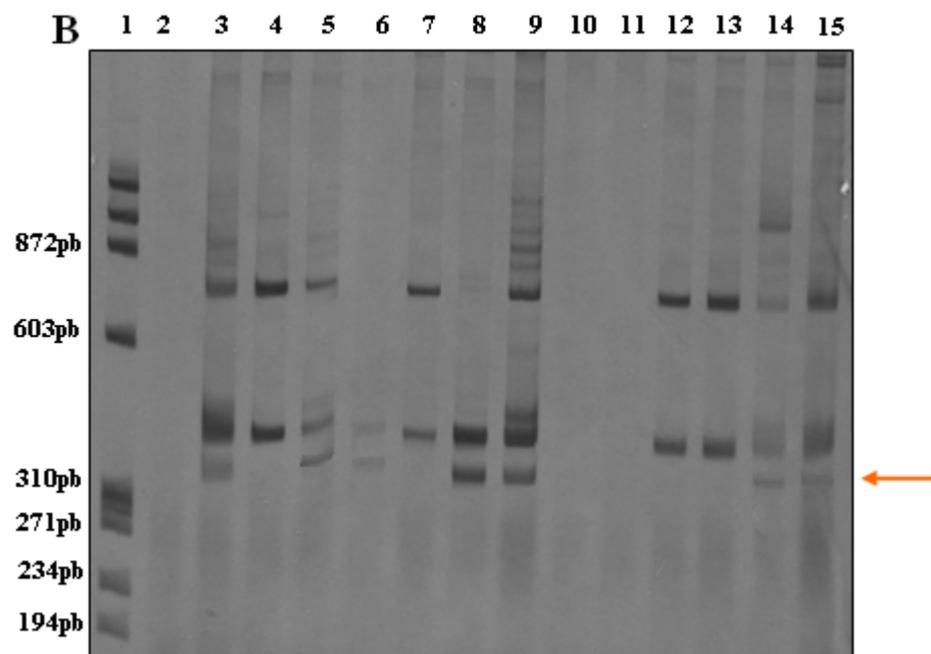
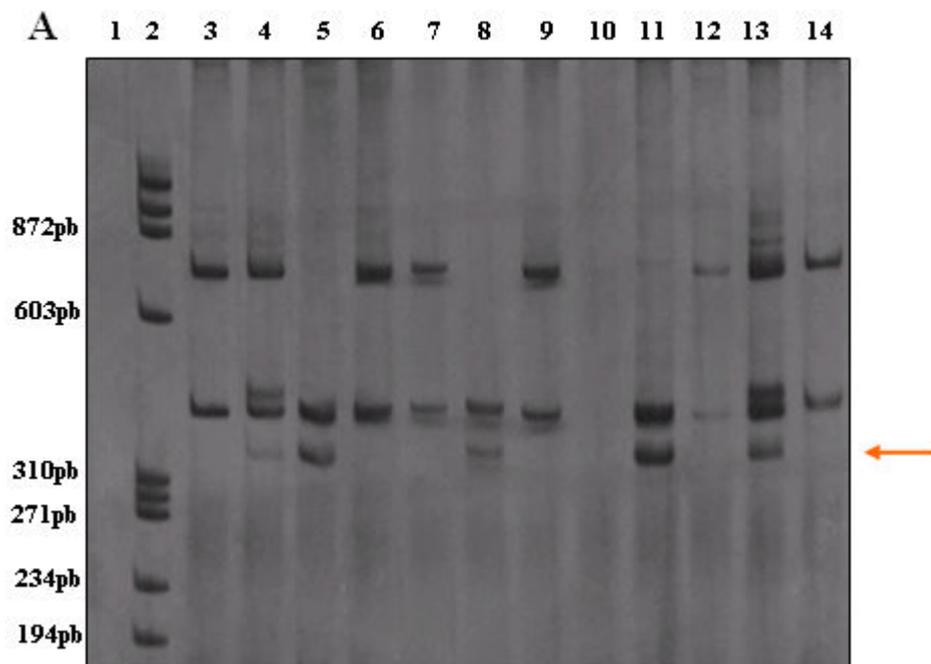
Coleta de caramujos	Número de caramujos capturados
1ª (4 meses pós-introdução)	443
2ª (11 meses pós-introdução)	117
3ª (14 meses pós-introdução)	213
Total de caramujos coletados	773

5.6.1 Análises moleculares

Dos caramujos coletados, após 4 meses da introdução, 50 exemplares foram submetidos à técnica PCR-RFLP. Das 35 amostras amplificadas e cortadas com a *DdeI*, 13 (37,1%) possuíam a banda de 350pb típica da linhagem introduzida, algumas destas podem ser visualizadas nas canaletas 4, 5, 8 e 11 da Figura 13 A.

Dos cinquenta exemplares coletados, após 11 meses de introdução, apenas 28 exemplares tiveram o seu DNA amplificado e digerido pela enzima de restrição *DdeI*. Destes, dez indivíduos (35,7%) possuíam a banda de 350pb, amostras estas que podem ser identificadas nas canaletas 3, 5, 6, 8, 9 e 14 da figura 13B. A redução do percentual do marcador molecular encontrado nos exemplares coletados após 11 meses da introdução não foi estatisticamente significativa quando comparado com o percentual apresentado pelo grupo de exemplares coletados após 4 meses da introdução ($p=0,910$). O pequeno número de amostras amplificadas deve-se ao fato dos problemas ocorridos durante a extração.

Quarenta exemplares de caramujos coletados após 14 meses da introdução tiveram o seu DNA amplificado pela técnica PCR_RFLP. Destes, 24 (60%) apresentaram o marcador molecular de 350pb típico da linhagem *B. tenagophila* do Taim. Este percentual foi significativamente maior quando comparado com os valores apresentados pelos grupos coletados 4 meses ($p= 0,048$) e 11 meses ($p= 0,049$) após a introdução (Gráfico 2). Algumas destas amostras podem ser visualizadas nas canaletas 2-5, 7-8 e 10-12 da figura 13 C. Os dados moleculares obtidos mostraram que o material genético da linhagem do Taim foi transmitido aos caramujos locais, após a introdução.



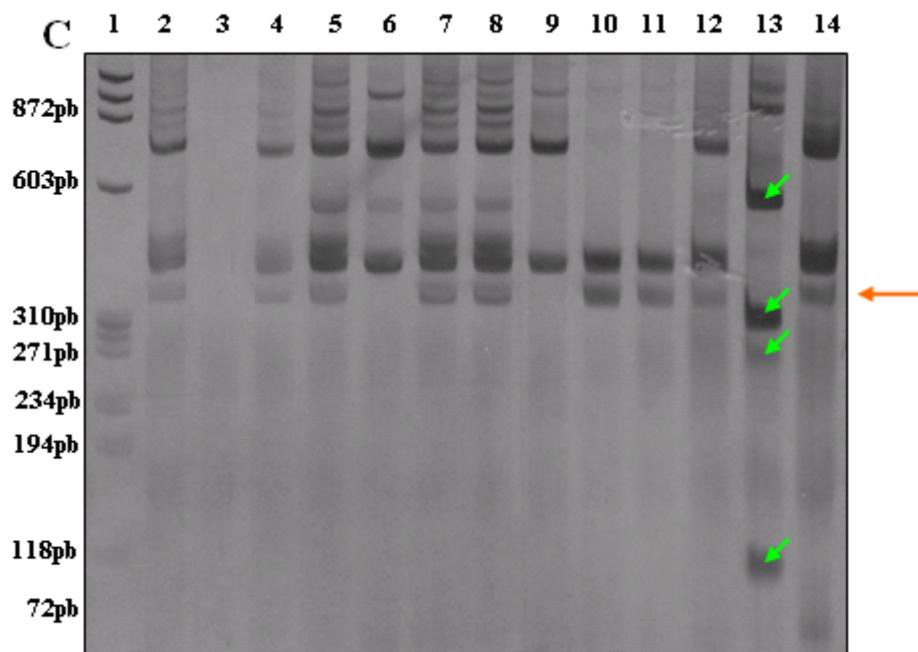


Figura 6: Géis de Poliacrilamida 6% corado pela prata demonstrando o perfil de restrição do fragmento de 1300pb, após digestão com a enzima de restrição *DdeI* dos exemplares de *B. tenagophila* coletados após 4, 11 e 14 meses da introdução. **A (4 meses):** 1 controle negativo da PCR_RFLP; 2: padrão de peso molecular Phix 174; 3, 6, 7, 12 e 14: *B. tenagophila* sem o marcador molecular; 4, 5, 8 e 11: *B. tenagophila* com o fragmento de 350pb (indicado pela seta vermelha), típico da linhagem do Taim; 13: *B. tenagophila* do Taim (controle positivo). **B (11 meses):** 1: padrão de peso molecular (Phix 174); 2: controle negativo da PCR; 4 e 7: *B. tenagophila*; 3, 5, 6, 8, 9 e 14: caramujos coletados apque apresentaram o fragmento de 350 pares de base típico do Taim; 15: *B. tenagophila* do Taim. **Em C):** nas canaletas 1, 3, 13 e 14 estão representados respectivamente, o padrão de peso molecular (Phix 174), o controle negativo, o Pool de cercárias de *S. mansoni* e o controle positivo (*B. tenagophila* do Taim). O fragmento de 350 pares de base de caráter dominante típico da linhagem do Taim está indicado pela seta e presente nas amostras aplicadas nas canaletas 2, 4, 5, 7, 8 10, 11 e 12. A seta vermelha indica a posição do marcador molecular de 350pb.

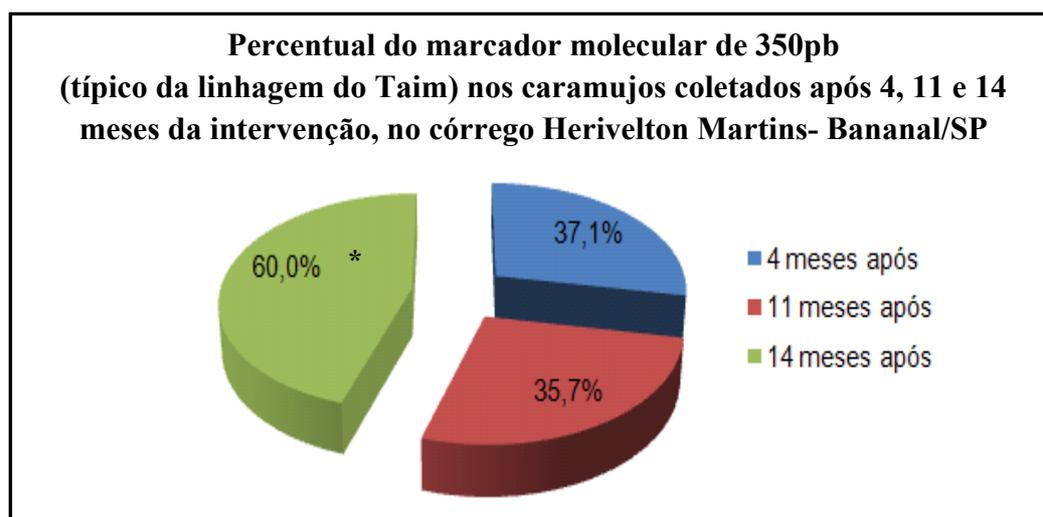


Gráfico 2: Percentual do marcador molecular de 350pb (típico da linhagem do Taim) presente nos caramujos coletados após a intervenção. * Diferença estatística em relação aos outros períodos após a introdução ($p < 0,05$) – Teste Qui-quadrado de Pearson.

5.6.1.1 PCR_RFLP dos trematódeos

As diferentes cerárias de trematódeos bem como os caramujos positivos também foram submetidos à técnica de PCR_RFLP sob as mesmas condições descritas anteriormente. A figura 14A mostra que a mistura de cercárias de *S. mansoni* (Canaletas 3-4) e Xiphidocercárias (canaletas 10-12) amplificam uma banda de aproximadamente 1000pb. Quando este fragmento foi submetido ao corte com enzima de restrição *DdeI* foi observado que a mistura de cercárias de *S. mansoni* apresentou 4 bandas em seu perfil de aproximadamente 600, 310, 271 e 100pb (canaletas 2 e 3 da figura 14B). Enquanto as amostras contendo o a mistura de Xiphidocercárias apresentaram em seu perfil 4 bandas de aproximadamente 500, 250, 150 e 72pb (canaletas 9 e 11 da figura 15B). Já a mistura de cercária caratinguensis quando submetida a PCR tem como produto de amplificação uma banda de aproximadamente 1300pb (canaletas 7-9 da figura 14A). Vale ressaltar que na *Biomphalaria* existe um fragmento também com 1300pb (canaletas 14 e 15 da figura 14A). Após o corte com a enzima *DdeI*, as amostras que continham a mistura destas cercárias demonstraram um perfil similar ao da *B. tenagophila*, ou seja apresentaram 2 fragmentos de aproximadamente 800 e 400pb que podem ser visualizados nas canaletas 6-8 da figura 14B.

B. tenagophila no período patente da infecção pelo *S. mansoni* apresentaram na PCR duas bandas bem fortes, uma de aproximadamente 1300pb e outra de aproximadamente 1000pb (canaletas 5 e 6 da figura 14A). Estes resultados mostram que a segunda banda é característica do parasito, já que caramujos não infectados apresentaram apenas a banda de

aproximadamente 1300pb (canaletas 14 e 15 da figura 14A). Quando amostras de *B. tenagophila* infectada por *S.mansoni* foram submetidas ao corte com a enzima DdeI, foi possível observar a presença das seguintes bandas: 603, 310 e 100pb (referente ao parasito) e 800 e 470pb (referentes ao caramujo) (canaletas 4 e 5 da figura 14B).

Na amostra que continha o DNA de *B. tenagophila* infectado por Xiphidocercárias foram observadas a banda 1000pb (referentes ao parasito) e a banda de aproximadamente 1300pb (referentes ao caramujo) (canaleta 13 da figura 14A). Nas canaletas 10 e 12 da figura 14B, referentes ao DNA de *B. tenagophila* infectada por Xiphidocercária, foram detectadas as bandas de 250, 150 e 72pb (referentes ao parasito) e 800 e 470pb (referentes ao caramujo).

O DNA de *B. tenagophila* infectado com a cercária caratinguensis não foi realizado devido à ausência de exemplares no campo positivos para este trematódeo.

A partir destes resultados pode-se inferir que o perfil de bandas dos trematódeos estudados não apresentou banda em comum ou coincidente com o marcador molecular típico da linhagem do *B. tenagophila* do Taim (350pb).

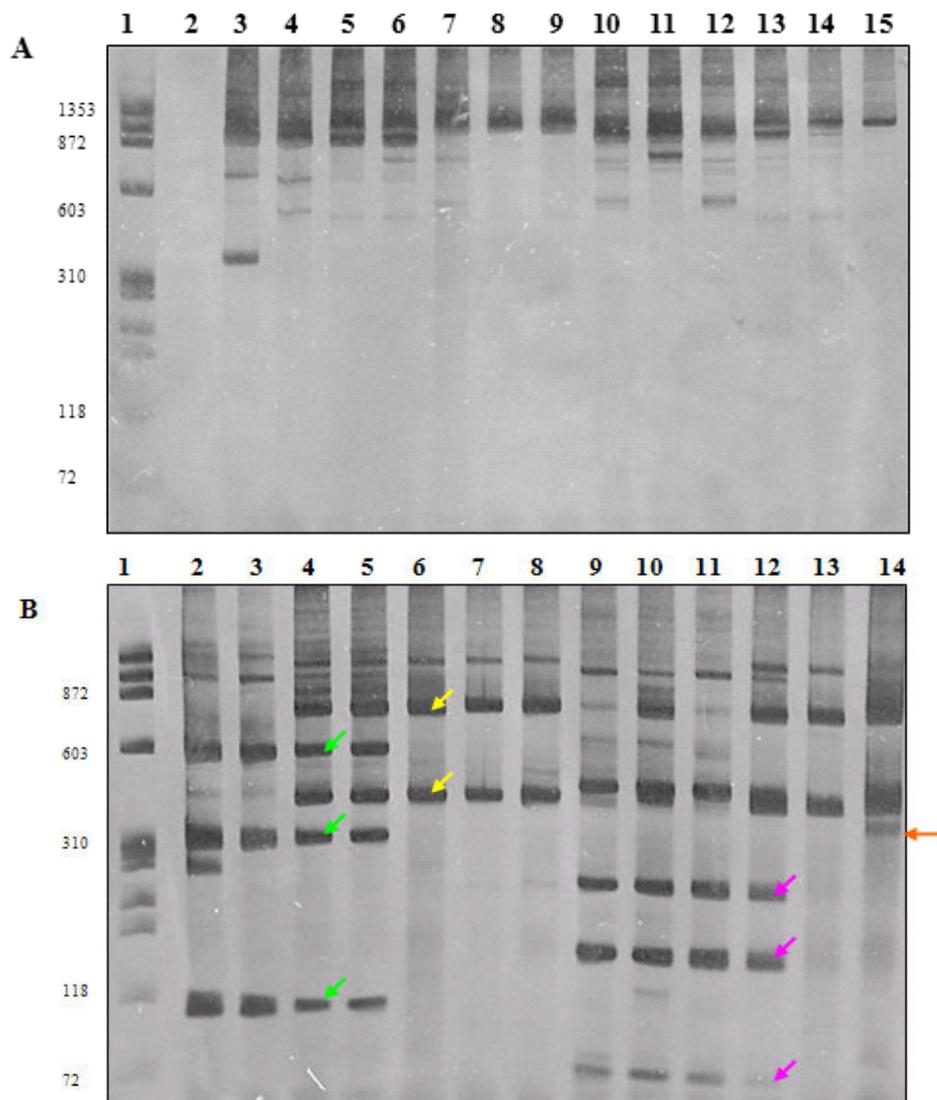


Figura 74: Géis de Poliacrilamida 6% corado pela prata contendo o perfil da PCR_RFLP de alguns trematodeos e *B. tenagophila* infectados e não infectados. **A (PCR)** Em 1: padrão de peso molecular (Phix 174); 2: controle negativo da PCR; 3 e 4: Pool de cercárias de *S. mansoni*; 5 e 6: *B. tenagophila* no período patente para *S. mansoni*; 7 a 9: Pool de cercária caratinguensis; 10-12: Pool de Xiphidocercárias; 13: *B. tenagophila* no período patente para Xiphidocercárias; 14 e 15: *B. tenagophila* não infectada. **B (RFLP)** 1: padrão de peso molecular (Phix 174); 2 e 3: as amostras contendo o Pool de cercárias de *S. mansoni*; 4 e 5: *B. tenagophila* infectada com *S. mansoni* e as setas verdes indicam bandas deste parasito; 6 a 8: perfil de restrição do Pool de cercária caratinguensis e as setas amarelas demonstram o perfil molecular coincidente com o de *B. tenagophila* (800 e 470pb); 9 e 11: Pool de Xiphidocercárias; 10 e 12: *B. tenagophila* infectada por Xiphidocercárias sendo que as setas rosa indicam bandas características do perfil deste trematóda no exemplar infectado; 13: *B. tenagophila* não infectada e 14: *B. tenagophila* do Taim (seta vermelha indica o marcador de 350pb).

5.6.2 Testes de infecção

Descendentes F1 de caramujos coletados antes e após a intervenção foram submetidos a três desafios à cepa SJ. Estes dados encontram-se sintetizados na tabela 4 e no gráfico 3. O primeiro desafio indicou que dos 70 F1 expostos (coletados antes da introdução) 57 sobreviveram. Destes, 35 estavam negativos e 22 estavam positivos, ou seja, a taxa de suscetibilidade deste grupo foi de 38,6%. Dos 70 F1 expostos (coletados 4 meses pós-introdução) 67 sobreviveram, sendo que 57 estavam negativos e 10 estavam positivos, a taxa de suscetibilidade deste grupo sobrevivente foi de 14,9%. Os dados deste primeiro teste de suscetibilidade indicaram que a introdução da linhagem *B. tenagophila* do Taim foi capaz de reduzir de modo significativo ($p=0,003$) a suscetibilidade dos caramujos locais coletados logo após os quatro meses de intervenção. Dos 70 exemplares *B. glabrata* infectados (controle positivo), 60 sobreviveram e todos eliminaram cercárias. A taxa de infecção deste grupo foi de 100%, o que demonstrou a viabilidade da cepa SJ de *S. mansoni* utilizada neste experimento.

No segundo desafio foram expostos 50 caramujos F1 (coletados antes da introdução), sendo que 47 sobreviveram. Destes, 35 estavam negativos e 12 estavam eliminando cercárias, ou seja, a taxa de infecção deste grupo foi de 25,5%. Por outro lado, dos 50 caramujos F1 expostos (coletado após 4 meses da introdução), 49 sobreviveram sendo que 47 foram negativos e dois estavam eliminando cercárias. A taxa de infecção destes caramujos foi reduzida para 4,1%. Assim como observado no primeiro desafio, ocorreu uma redução significativa da suscetibilidade dos caramujos locais ($p=0,003$) coletados após os quatro meses de introdução. A taxa de infecção dos caramujos F1 (coletados 11 meses pós-introdução) foi 17%, pois dos 47 sobreviventes, 39 estavam negativos e oito liberaram cercárias. Entretanto este valor não foi estatisticamente significativo quando comparado com os grupos de exemplares F1 coletados antes ($p=0,315$) e após 4 meses de introdução ($p=0,078$). No grupo controle (*B. glabrata*) infectado, todos os 34 exemplares sobreviventes liberaram cercárias, apresentando 100% de positividade para cepa SJ de *S. mansoni*.

Um terceiro experimento foi realizado para confirmar os resultados obtidos nos dois primeiros desafios. Cinquenta caramujos F1 (coletados antes da infecção) foram expostos à cepa SJ de *S. mansoni*, sendo que ao final de 60 dias havia 49 exemplares vivos. Destes, 36 estavam negativos e 13 estavam positivos, ou seja, a taxa de infecção foi de 26,5%. Para os exemplares F1 coletados após 11 meses, foram encontrados 44 sobreviventes, sendo 41 negativos e três positivos. A taxa de infecção deste grupo caiu para 6,8% e este valor foi estatisticamente significativo quando comparado com o grupo coletado antes da introdução

($p=0.012$). O exame dos exemplares coletados após 14 meses da introdução demonstrou que 48 sobreviveram à infecção. Destes 47 estavam negativos e apenas um estava positivo, sendo o número de caramujos suscetíveis reduzido para 2,1%. Ao comparar o número de caramujos suscetíveis dos grupos de caramujos F1 coletados antes e após 14 meses foi observada uma queda significativa no número de caramujos infectados ($p= 0,001$). Entretanto, como já era esperado não houve diferenças estatísticas entre as taxas de infecção dos grupos de caramujos F1 coletados após 11 e 14 meses ($p= 0.55$). Neste último experimento não foi possível realizar, em tempo para esta defesa de dissertação, o desafio dos exemplares coletados após 4 meses da introdução em função da ausência de um número mínimo de caramujos no tamanho definido para exposição.

Tabela 4: Resultados dos desafios realizados com descendentes F1 dos caramujos coletados antes, após 4, 11 e 14 meses da introdução de *B. tenagophila* do Taim, no córrego Herivelton Martins, em Bananal/SP.

Espécie/ Localidade/ Experimento	Período de Coleta	Nº de caramujos expostos	Nº de sobreviventes	Nº de caramujos eliminando cercárias	Taxa de infecção total (%)	Taxa de infecção dos sobreviventes (%)
<i>B. tenagophila</i> Herivelton Martins 1º desafio	Antes da introdução	70	57	22	31,4	38,6
	Após 4 meses da introdução	70	67	10	14,3	14,9
<i>B. tenagophila</i> Herivelton Martins 2º desafio	Antes da introdução	50	47	12	24	25,5
	Após 4 meses da introdução	50	49	2	4	4,1
	Após 11 meses da introdução	50	47	8	16	17
<i>B. tenagophila</i> Herivelton Martins 3º desafio	Antes da introdução	50	49	13	26	26,5
	Após 11 meses da introdução	50	44	3	6	6,8
	Após 14 meses da introdução	50	48	1	2	2,1

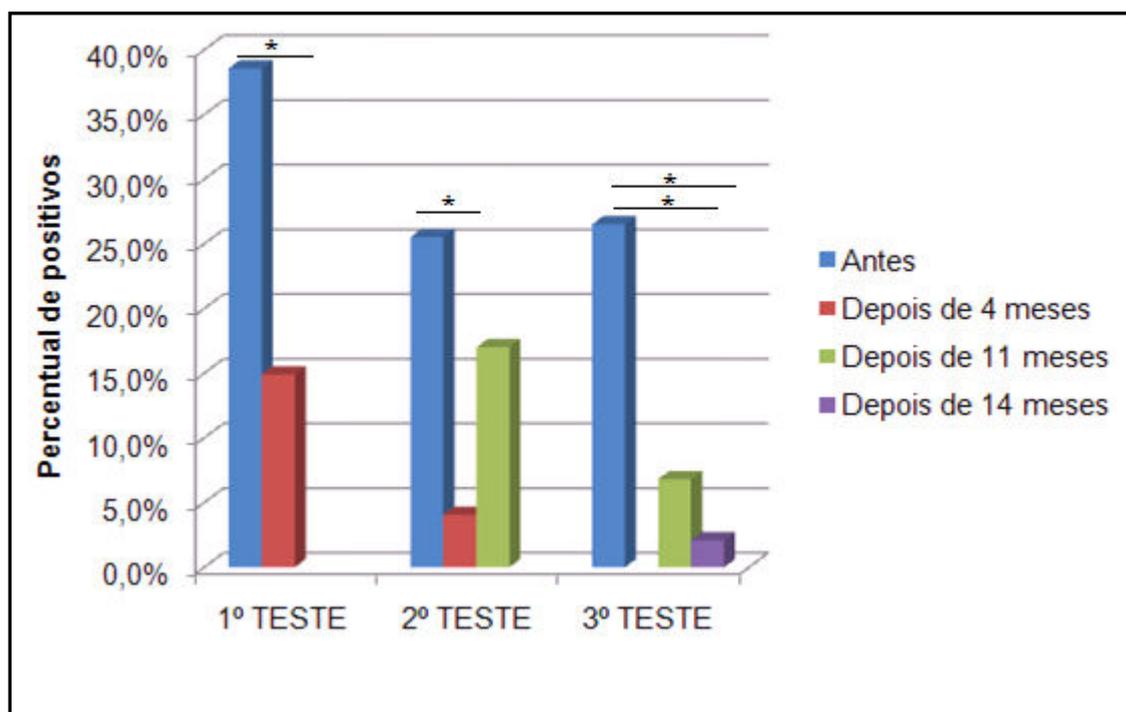


Gráfico 3: Resultado dos testes de infecção realizados com os descendentes F1 de caramujos coletados antes e após a introdução. * Diferença estatística entre os descendentes F1 grupos coletados antes e após a introdução ($p < 0,05$) Teste Qui-quadrado de Pearson.

5.6.3 Detecção do marcador molecular da linhagem do Taim nos caramujos sobreviventes após a infecção por *S. mansoni*

Para verificar se havia alguma correlação entre a resistência e a presença do marcador de 350pb, os descendentes F1 de caramujos positivos e negativos dos dois primeiros desafios foram submetidos à técnica de PCR_RFLP. No primeiro desafio, foi observado que dos 10 exemplares de caramujos coletados após 4 meses da introdução, submetidos à exposição que se positivaram, apenas um (10%) apresentou o marcador molecular de 350pb (canaleta 5 da figura 15 - seta vermelha). A canaleta 7 representa amostra de exemplares positivos que não apresentaram o marcador. Por outro lado, dos 23 exemplares negativos, 14 (60,8%) apresentaram este marcador (canaletas 9 a 13 da figura 15). Na canaleta 8 foi incluída uma amostra representando os exemplares negativos sem o marcador. Foi possível observar que a proporção do marcador de 350pb foi significativamente maior entre os caramujos negativos do que entre os positivos (coletados após 4 meses de introdução) ($p = 0,017$). Neste mesmo gel também podem ser observadas amostras do pool de cercárias de *S. mansoni* (canaleta 14), um controle com exemplar *B. tenagophila* do Taim (canaleta 15), bem como de descendentes F1 de caramujos coletados antes da introdução que foram submetidos à infecção, sendo que nas canaletas 3 e 4 são de exemplares positivos e na canaleta 6 de exemplar negativo.

No segundo desafio, foram analisados descendentes F1 de caramujos coletados após 4 e 11 meses da introdução submetidos à infecção por *S. mansoni*. Dos caramujos que se infectaram, nenhum (0%) apresentou o marcador molecular de 350pb. Em contrapartida, nos exemplares negativos, o marcador de 350pb estava presente em 16 (66,6%) dos 24 indivíduos analisados. (canaletas 8 a 13 figura 16A). Embora, a proporção do marcador molecular tenha sido maior no grupo de caramujos negativos coletados após 4 meses, a análise estatística, feita para estes dois grupos, não mostrou diferenças estatisticamente significativas ($p=0,277$). Nos caramujos F1 coletados após 11 meses da introdução negativos ao desafio, o marcador foi encontrado em 13 (56,6%) dos 25 indivíduos analisados (Canaletas 9 a 13 da figura 16B). Enquanto, o marcador estava ausente em todos os caramujos F1 positivos analisados. Ao comparar a presença do marcador entre os caramujos negativos e positivos (coletados após 11 meses) foi observado que existem diferenças estatísticas significativas entre estes dois grupos ($p= 0.018$). Na figura 16A podem ser visualizadas amostras representando exemplares expostos ao parasito, positivos (canaleta 6) e negativos (canaleta 7), coletados após 4 meses da introdução que não apresentaram o marcador molecular. Na figura 16B observam-se 3 amostras de caramujos positivos (canaletas 3, 4 e 7) e 3 amostras de caramujos negativos (canaletas 5, 6 e 8) coletados após 11 meses da introdução, também sem o marcador molecular. No gel 16A, também foram incluídas amostras representando os descendentes F1 coletados antes da introdução positivos (canaletas 3 e 4) e negativos (canaleta 5), a fim de evidenciar a ausência do marcador de 350pb e demonstrar o perfil molecular de *S. mansoni* em exemplares positivos diferenciando-o dos exemplares negativos. O perfil molecular do parasito foi representado na canaleta 14 e o controle *B. tenagophila* do Taim foram aplicado na caneta 15 de ambos os géis da figura 16. Em todas as amostras contendo exemplares *B. tenagophila* positivos foram observadas apenas três das quatro bandas encontradas no perfil molecular do pool de cercárias de *S. mansoni*. Os resultados moleculares encontram-se sintetizados na tabela 5 e a proporção do marcador molecular encontrada para os caramujos positivos e negativos estão ilustrados no gráfico 4. Os caramujos submetidos ao terceiro desafio não estão sendo apresentados, pois ainda estão sendo realizados testes moleculares.

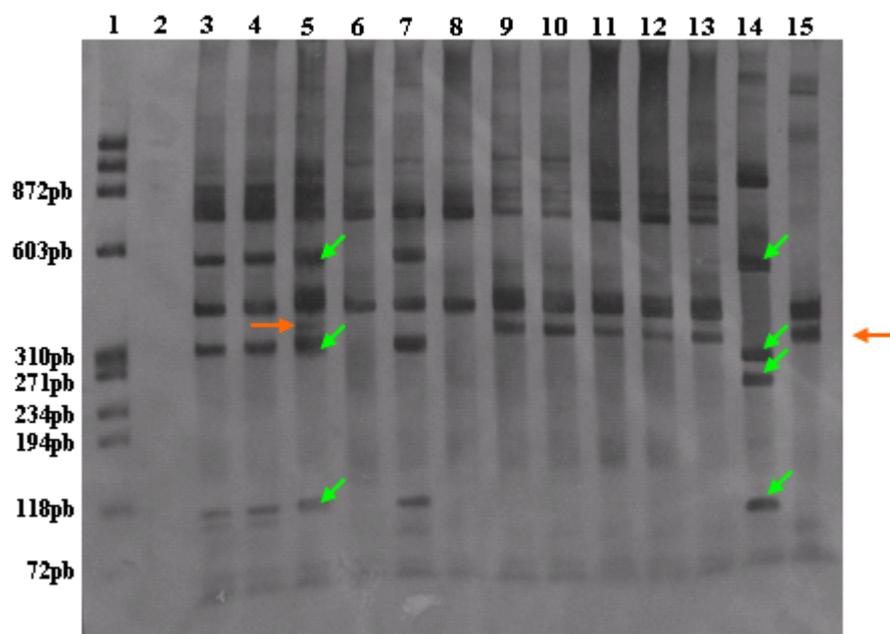


Figura 85: Gel de Poliacrilamida 6% corado pela prata demonstrando a PCR_RFLP dos sobreviventes da geração F1 submetidos ao 1º teste de infecção. Em 1: Padrão de peso molecular (Phix174); 2: Controle negativo da PCR; 3, 4 e 6: F1 de moluscos coletados antes da introdução que não apresentaram o marcador molecular de 350pb típico da linhagem do Taim, sendo 3 e 4 exemplares positivos e 6 de exemplar negativo; 5, 7 e 8: F1 de moluscos coletados após 4 meses da introdução, sendo: 5 caramujo positivo com o marcador de 350pb, 7 caramujo positivo sem o marcador molecular e 8 caramujo negativo sem o marcador molecular; 9 a 13: *B. tenagophila* negativos, coletados após 4 meses e que apresentaram o marcador molecular de 350pb; 14 e 15: Pool de cercárias de *S. mansoni* (4 bandas indicadas pelas setas verdes) e *B. tenagophila* do Taim (seta vermelha indica o marcador molecular de 350pb).

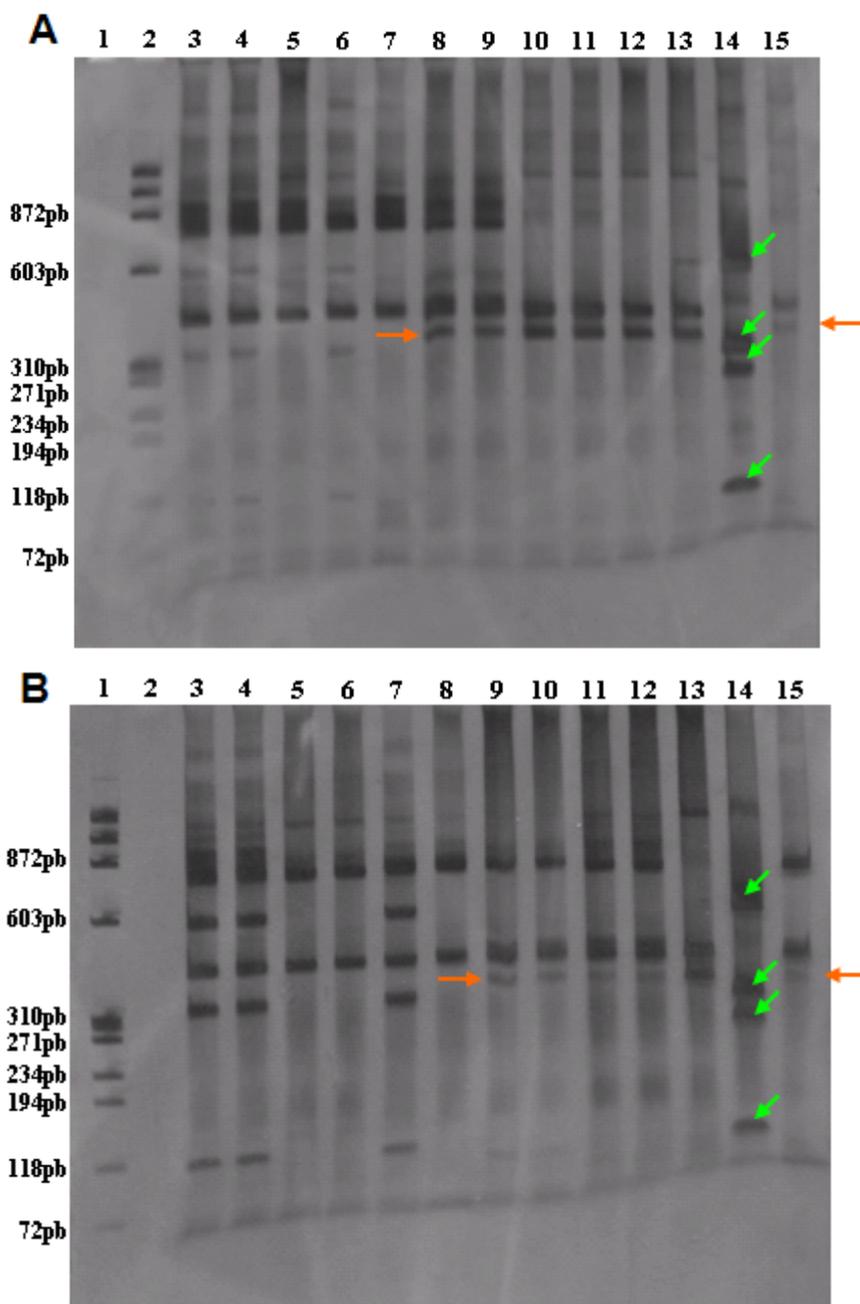


Figura 16: Géis de Poliacrilamida 6% corado pela prata demonstrando a PCR_RFLP dos sobreviventes submetidos do 2º desafio. Sendo, **A (coletados antes e após 4 meses da introdução)**. Em 1: controle negativo da PCR; 2: padrão de peso molecular (Phix 174); 3 a 5: *B. tenagophila* coletadas antes da introdução (positivos e negativos) sem o marcador molecular; 6 e 7: *B. tenagophila* coletados após 4 meses da introdução, sendo 6 caramujo positivo e 7 caramujo negativo ambos sem o marcador molecular; 8 a 13: *B. tenagophila* negativos que apresentaram o marcador molecular de 350pb; 14: Pool de cercárias de *S. mansoni* (bandas indicadas pela seta verde); 15: *B. tenagophila* do Taim (marcador de 350pb indicado pela seta vermelha). **B (coletados após 11 meses da introdução)**. 1: controle negativo da PCR; 2: Padrão de peso molecular (Phix 174); 3, 4 e 7: caramujos positivos sem o marcador; 5, 6 e 8: caramujos negativos sem o marcador. canaletas 9-13: caramujos negativos com o marcador; 14: PCR_RFLP de *S. mansoni*; 15: *B. tenagophila* do Taim.

Tabela 5: Resultados da PCR_RFLP dos caramujos sobreviventes submetidos ao 1º e 2º desafios por *S. mansoni*.

	Amostras analisadas				Valor-p n
	Negativos		Positivos		
	n	%	n	%	
1º (4 meses)					
Com marcador	14	60,9%	1	10,0%	0,017**
Sem marcador	9	39,1%	9	90,0%	
2º (4 meses)					
Com marcador	16	66,7%	0	0,0%	0,277
Sem marcador	8	33,3%	2	100,0%	
2º (11 meses)					
Com marcador	13	52,0%	0	0,0%	0,018**
Sem marcador	12	48,0%	8	100,0%	

** Valores estatisticamente significativos ($P < 0,05$) - Teste exato de Fisher - n= número de amostras.

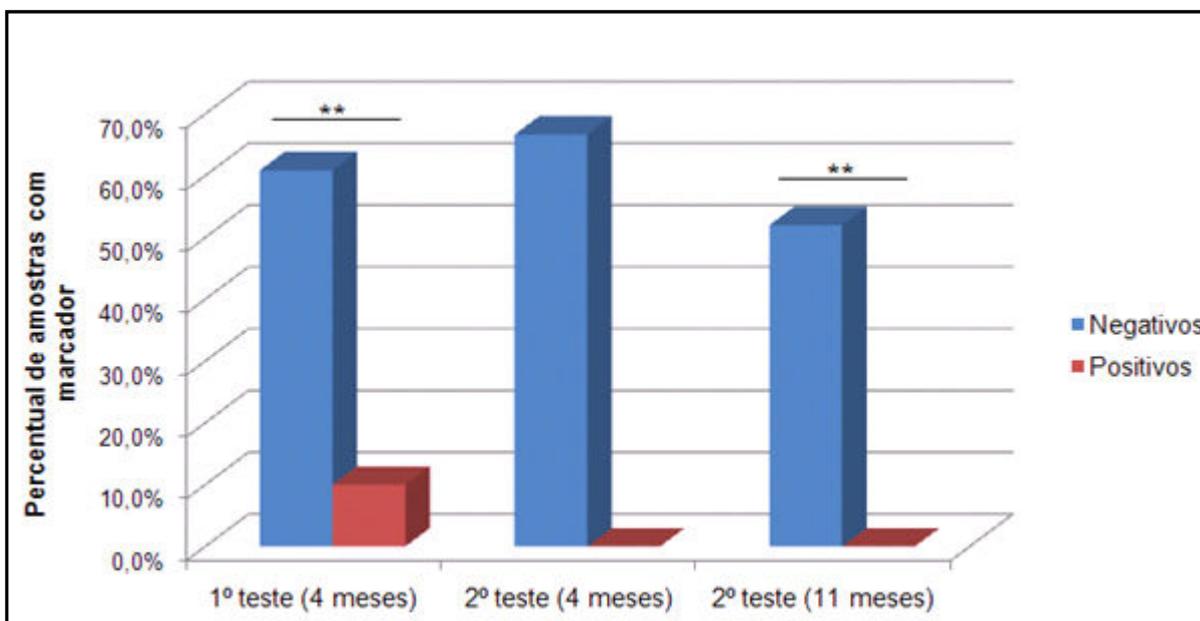


Gráfico 4: Comparação da ocorrência do marcador molecular de 350pb nos sobreviventes após a introdução. ** Valores estatisticamente significativos ($P < 0,05$) - Teste exato de Fisher.

6 DISCUSSÃO

A eficácia do modelo experimental de transferência da resistência de *B. tenagophila* da linhagem do Taim ao *S.mansoni* para linhagens locais suscetíveis, em coleções hídricas no Município de Bananal/SP foi primeiramente avaliada por Rosa (2008). Com o intuito de dar continuidade a este experimento uma nova área foi escolhida, denominada córrego Herivelton Martins. Este córrego está localizado em uma propriedade particular e em regiões de cachoeiras próprias para o banho, porém afastadas da área urbana o que permitiu menores intervenções antrópicas durante a realização do trabalho.

Todos os exemplares coletados neste córrego foram identificados como *B. tenagophila* e os testes parasitológicos indicaram que nenhum destes estava eliminando cercárias de *S. mansoni*. Entretanto, foram encontrados exemplares no córrego sob intervenção eliminando Xiphidocercária. Estes dados corroboram com os trabalhos realizados por Moraes *et al*, (2009) e Thiengo *et al*, (2001, 2002ab, 2004) que mostraram ser frequente o encontro de exemplares *B. tenagophila* coletados no campo eliminando cercárias destes e outros trematódeos Digenea. Recordando, Teles *et al*, (2002 ab) relataram que *B. tenagophila* é a principal espécie transmissora da esquistossomose não apenas no Município de Bananal/SP como em todo vale do rio Paraíba do Sul.

Após a realização desta nova pesquisa malacológica, 800 indivíduos *B. tenagophila* do Taim foram marcados e introduzidos no córrego Herivelton Martins para testar o modelo ora proposto. A estimativa da densidade populacional de *B. tenagophila* local e da população introduzida no córrego, após 15 dias da introdução, somente foi possível devido ao método de marcação da concha desenvolvido por Coelho *et al*, 1986. Conforme descrito anteriormente, a população resistente introduzida foi inferior à população local (37,5%). Segundo Rosa (2008) há uma relação direta entre a proporção de caramujos locais e introduzidos para o sucesso da inserção do patrimônio genético da linhagem resistente. Entretanto neste trabalho foi observado que mesmo em baixa proporção, a população *B. tenagophila* do Taim foi capaz de transmitir o seu material genético aos seus descendentes, visto que a proporção do marcador molecular de 350 pb foi encontrada em 37.1% (4 meses), 35% (11 meses) e 60% (14 meses), dos indivíduos analisados. A proporção do marcador molecular encontrada após 11 meses da introdução pode ser questionada, já que um número bem menor de amostras foi analisado em função dos problemas com a extração do DNA. Por outro lado, a porcentagem deste marcador aumentou consideravelmente após os 14 meses de introdução. Estes dados corroboram com os dados obtidos por Rosa *et al*, (2004), em condições laboratoriais, ao analisar o perfil molecular das progênies F1 e F2 obtidas do cruzamento entre *B. tenagophila* do Taim

(resistente) e *B. tenagophila* de Joinville (suscetível). Os autores observaram que o fragmento de 350 pb estava presente em 100% dos descendentes F1 e em 75% dos indivíduos F2. Este padrão sugere que esse marcador possui caráter dominante com segregação tipicamente mendeliana. Esta banda, apesar de não relacionada com a resistência à infecção, constitui um marcador genético importante no monitoramento das áreas onde essa linhagem está sendo introduzida.

De acordo com Barbosa & Barbosa (1994) diferentes pressões ambientais podem influenciar a distribuição da densidade populacional de *B. tenagophila*. Teles *et al*, (2002) observaram em seus experimentos que variações sazonais interferiram nas densidades populacionais de *B. tenagophila*. De acordo com a pluviometria registrada no período de Janeiro de 2010 a Outubro de 2011, as maiores médias ocorreram em janeiro (9,69 mm) e dezembro (14,9 mm) de 2010 e apesar de não terem sido realizadas coletas mensais de caramujos, foi observado que a chuva interferiu nas densidades da população de *B. tenagophila*.

Para verificar o impacto da introdução da linhagem resistente sobre alteração da suscetibilidade da população pós-introdução, os indivíduos coletados antes e após as intervenções foram submetidos aos testes de infecção com a cepa SJ de *S.mansoni*. Esta cepa foi à escolhida, pois é a mais adaptada à *B. tenagophila* procedentes de regiões do Vale do Paraíba e Ribeira (Chieffi, 1975; Paraense & Corrêa, 1978; Guimarães *et al*, 2010 e ensaios preliminares deste estudo relatados anteriormente). Os testes de suscetibilidade foram realizados com os descendentes F1 provenientes dos caramujos coletados no campo antes e após a introdução e estes mediam entre 6 a 8 mm de diâmetro. Este tamanho foi o escolhido, pois os indivíduos mais jovens são mais suscetíveis à infecção por *S.mansoni* (Richards, 1970; Richards & Merritt Jr., 1972).

Os resultados obtidos nos três testes de infecção realizados com exemplares coletados no córrego Herivelton Martins antes e após a introdução mostraram que ocorreu uma pequena variação entre os testes. Entretanto, todos eles indicam uma redução significativa na suscetibilidade dos caramujos locais coletados após a introdução, ou seja, a linhagem resistente introduzida foi capaz de alterar a suscetibilidade da população pós-introdução. Estes dados corroboram os estudos realizados por Rosa *et al* 2005 e Rosa *et al*, 2006 que demonstraram, em condições laboratoriais, que o caráter da resistência de *B. tenagophila* do Taim é dominante. Portanto, os dados de suscetibilidade dos caramujos locais coletados após as introduções indicam que o gene ou genes da resistência de *B. tenagophila* foram transmitidos à população por meio de cruzamentos. Como este caráter é dominante justifica-

se o fato de obtermos um grande número de indivíduos resistentes ao longo do período estudado. Para confirmar tais resultados outro teste de infecção está em andamento.

Sabe-se que a presença banda de 350 pb é apenas um marcador da população *B. tenagophila* do Taim e não corresponde ao gene da resistência. No presente estudo foi observada uma maior frequência deste marcador, justamente, nos caramujos resistentes que nos caramujos positivos considerando a probabilidade estatística de estar junto com o (s) gene (s) da resistência (segregação mendeliana). Embora os caramujos positivos do segundo desafio (coletados após 4 meses da introdução) não apresentem o marcador e o mesmo presente em 66,6% dos caramujos negativos, a análise estatística feita para estes dois grupos mostrou que não há diferenças estatisticamente significativas entre eles e isso pode ser devido à reduzida frequência de exemplares positivos no teste (n=2). Por outro lado os caramujos coletados após 11 meses da introdução, negativos ao teste de infecção, o marcador foi encontrado em 56.6% dos indivíduos analisados, enquanto este estava ausente em todos os caramujos positivos (n=8). Neste caso, a ocorrência do marcador em amostras negativas também foi maior que nas amostras positivas e este valor foi estatisticamente significativo. A maior ocorrência do marcador típico da linhagem do Taim justamente nos indivíduos resistentes (caramujos que não eliminaram cercárias) indica associação do marcador com o (s) gene (s) da resistência aos descendentes, considerando que ambos possuem o caráter dominante.

Neste estudo foi possível observar que ao longo de 14 meses a suscetibilidade dos caramujos locais que inicialmente era de 25% caiu significativamente para 2.1% nos descendentes logo, o material genético do Taim foi inserido com sucesso aos mesmos após a introdução, acompanhando a proporção do marcador molecular encontrado que passou de 37,5% (4 meses) para 60% (14 meses). Um novo teste de infecção está sendo analisado a fim de confirmar a suscetibilidade dos exemplares coletados após este período, bem como a verificar o percentual de dos sobreviventes negativos pós-introdução.

A PCR_RFLP, descrita como uma técnica de extrema utilidade na identificação das principais espécies brasileiras de *Biomphalaria* (Vidigal *et al*, 1998), foi utilizada para demonstrar o perfil de outros trematódas com os iniciadores ETTS1 e ETTS2 a fim de verificar se em algum deles havia o marcador molecular de aproximadamente 350pb que se superpusesse ao marcador típico da linhagem *B. tenagophila* do Taim . Porém, quando naturalmente infectados com outros trematódeos digenea, foi observado que nenhum dos trematódeos (Xiphidocercárias, cercária caratinguensis e *S. mansoni*) apresentou banda similar ao marcador de 350pb.

Finalmente, este trabalho apresentou resultados parciais que servem para analisar criticamente o modelo proposto apontando aspectos que podem afetar o sucesso da introdução ao longo dos meses do ano. Os resultados obtidos através dos testes e de suscetibilidade demonstram a necessidade de repetição de alguns experimentos, apesar de indicarem uma possível relação entre as proporções do marcador molecular e diminuição na suscetibilidade dos exemplares coletados após a intervenção. Assim o modelo de controle biológico através da introdução da linhagem resistente no campo necessita de mais estudos para se validado e posteriormente se torne uma estratégia alternativa no controle da transmissão da esquistossomose, possível de ser utilizada. Por outro lado o uso do modelo proposto, após uma aplicação de moluscicida (niclosamida), antes da introdução, poderia acelerar e favorecer enormemente a inserção do patrimônio genético da linhagem do Taim após introdução. Estudos estão em andamento para testar esta hipótese.

7 CONCLUSÕES

- O sucesso da criação em larga escala de *B. tenagophila* do Taim possibilitou a introdução de um grande número de exemplares da linhagem resistente no córrego Herivelton Martins.
- A linhagem introduzida *B. tenagophila* do Taim foi capaz de transmitir seu patrimônio genético aos descendentes F1 conforme observado após 4, 11 e 14 meses da introdução.
- O caráter de resistência ao *S. mansoni*, da linhagem resistente *B. tenagophila* do Taim, está sendo transmitido, com êxito, aos descendentes após intervenção, pois a suscetibilidade da população caiu ao longo do tempo.
- A ocorrência do marcador molecular de 350 pb, típico da linhagem do Taim foi significativamente maior nos indivíduos negativos que nos caramujos positivos.

8 ANEXO

Este artigo contempla os resultados referentes ao estabelecimento da criação em larga escala de *B. tenagophila* (Taim/RS) localizada na chácara Santa Inês, Bananal/SP, cuja metodologia foi descrita na sessão 4.6. O título do artigo, os autores e instituições correspondentes estão sendo apresentados abaixo.

Título: Breeding of *Biomphalaria tenagophila* in mass scale

Autores: Florence Mara Rosa ^I, Daisymara P. Almeida Marques ^{II}, Engels Maciel ^{III}, Josiane Maria Couto ^{III}, Deborah A. Negrão-Corrêa ^{IV}, Horácio M. Santana Teles ^V, João Batista dos Santos ^V, Paulo Marcos Zech Coelho ^{II*}

Instituições correspondentes:

I Laboratório de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, Brasil

II Laboratório de Esquistossomose, Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ, Av. Augusto de Lima 1715, CEP 30190-002, Belo Horizonte, MG, Brasil.

III Chácara Santa Inês, Bananal, São Paulo, Brasil.

IV Laboratório de Esquistossomose, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil.

V Superintendência de Controle de Endemias do Estado de São Paulo/SUCEN, São Paulo, Brasil.

***Correspondence to:** Prof. Paulo Marcos Zech Coelho

Chefe do Laboratório de Esquistossomose – Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ - Av. Augusto de Lima, 1715 – CEP 30190-002, Belo Horizonte, MG, Brasil

Tel: +55 31 3349-7740

E-mail: coelhohpm@cpqrr.fiocruz.br

Periódico: Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. (Manuscrito em preparação).

SUMMARY

An efficient method for breeding *Biomphalaria tenagophila* (Taim lineage/RS) was developed over a 5-year-period (2005-2010). Special facilities were planned, consisting of four cement tanks (9.4 x 0.6 x 0.22 m), with their bottom covered with a layer of sterilized red earth and calcium carbonate. Standard measures were adopted, as follows: each tank should contain an average of 3000 specimens, and would be provided with a daily ration of 35.000 mg complemented with lettuce. The development of a heating system by green-house effect was constituted of movable covers of dark canvas, which allowed the temperature control between 20 – 24 ° C. This system was essential, mainly on the coldest months of the year. Approximately 27.000 specimens with 12 mm diameter or more were produced for a 14-month-period. The mortality rates of the newly-hatched and adult snails were 77% and 37%, respectively. The follow-up of the development system related to 310 specimens of *B. tenagophila* demonstrated that 70-day-old snails reached an average of 17.0 ± 0.9 mm diameter. The mortality rates and the development performance of the snails genus *B. tenagophila* can be considered as highly satisfactory, when compared with results of the literature related to works carried out with different species of the species *Biomphalaria*, under controlled laboratory conditions.

Keywords: Mass scale breeding; *Biomphalaria*; *Biomphalaria tenagophila*; resistant lineage; *Schistosoma mansoni*.

INTRODUCTION

The mass scale breeding of snails genus *Biomphalaria* under laboratory conditions has been described by several authors, and the great majority of the published works was carried out using *Biomphalaria glabrata*, not only because it is the species with the highest susceptibility to *Schistosoma mansoni*, but also for the ease of breeding and maintenance under laboratory conditions^{30,26,23,14,7,28}. Specimens of *B. glabrata* infected in laboratory can eliminate an average of 6.061 cercariae per snail²⁹. The good reproductive performance of *B. glabrata* is also another favorable factor^{21,15,16,14}. Starting off to establishment of the evolutive cycle of *S. mansoni* under laboratory conditions, it was possible to conduct basic and applied researches on schistosomiasis, resulting in many thousands of scientific articles published in specialized journals, as well as allowing the production of antigens from cercariae, schistosomules, worms, and *S. mansoni* eggs, which were and will be used in diagnostic methods and development of vaccines. Some techniques related to breeding of *Biomphalaria*

in large scale, that were already published, refer to breeding under laboratory conditions, and the major fact analyzed was generally the type of food provided^{8,24,23}. The doctoral thesis presented by Freitas (1973)¹⁴ represents the most complete work related to the growth rhythm of *B. glabrata*, and the standardization of the technique for large scale breeding. In the mentioned work, factors such as temperature, lighting, water quality, amount of food available, and influence of the “crowding” effect were studied, aiming at improving the breeding techniques, and above all to evaluate the ideal conditions for the proper development of the snail. Although *B. tenagophila* and *B. straminea* are less susceptible to *S. mansoni* than *B. glabrata*, they have an important role in schistosomiasis transmission in South, Southeast, and Northeast regions in Brazil. The need for breeding albino *B. straminea* (resistant to *S. mansoni* infection), in large scale, presented as a result an efficient technique described by Barbosa in 1995². As far as *B. tenagophila* is concerned, up to now there is no publication in the literature related to standardization of a method for large scale breeding of this species. The few works concerning the development of *B. tenagophila* were conducted under laboratory conditions, by Kawazoe in 1976 and 1977^{15,16}. Studies related to the embryonic development of *B. glabrata* and *B. tenagophila*, under laboratory conditions, for 1-year-period, demonstrated that there are no significant differences of the embryonic period duration between the two species¹⁵. The averages of embryonic period detected for *B. glabrata* and *B. straminea* were 7.6 and 8 days, respectively. The same author observed that *B. glabrata* was more fertile than *B. tenagophila*¹⁶. The very few works that specifically target studies on the development rhythm, as well as on the breeding of *B. tenagophila* in mass scale, constituted the major difficulty found by our research group for obtaining the production of thousands of *B. tenagophila* (Taim lineage) specimens. This lineage is absolutely resistant to *S. mansoni*, and has been the subject of various studies^{27,13,5,6,17,18,25,1,20,19}. Among these studies, the model for biological control of schistosomiasis transmission is highlighted. It consists the transference of resistance to *S. mansoni* from *B. tenagophila* (Taim/RS) to the local susceptible lineage by means of crossbreedings, since the resistance gene has a dominant character²⁵. Nevertheless, in order to test this model in field, numerous specimens of *B. tenagophila* Taim are required in areas where the transmission is maintained by *B. tenagophila*¹¹. The municipality of Bananal, in the State of São Paulo, Brazil, was the area chosen for introduction, taking into account the comprehensive malacological studies and the evidence of the exclusive presence of *B. tenagophila* in the mentioned area³¹. The aim of the present work was to establish an effective method for breeding *B. tenagophila* (Taim lineage) specimens in large scale. This would be of the utmost

importance to meet the great demand for specimens used in experiments performed under field and laboratory conditions, and may also serve to base future studies with other species of the genus *Biomphalaria*.

METHODOLOGY

Breeding of B. tenagophila (Taim) in large scale: Location and assembly of the tanks: With the purpose of introducing *B. tenagophila* (Taim, RS) in endemic areas where *B. tenagophila* is the main transmitter species, a large scale breeding was launched at the “Chácara Santa Inês – Vila Bom Jardim” in Bananal, State of São Paulo. Throughout the period 2005-2010, the snails were successfully bred in a shed. From 2010 onwards, new facilities for mass scale breeding were designed, which were bigger and better adapted for the purpose of breeding *Biomphalaria* (Fig. 1 A e B). The new facilities consist of 4 large cement tanks, measuring 9.4 m long x 0.2 m deep x 0.6 m wide, with a capacity of 1240 liters. The bottom of each tank was covered with a layer of red earth, sterilized in an oven at 150° C, plus 10% calcium carbonate. All tanks contain in the center a PVC pipe, with 0.2 m high, and topped with screen functioning as a drain for the water change. The bottom of the tanks has a stopper, which may be removed, thus facilitating the flow of water during the periodic cleaning process. In order to avoid that *Culicidae* females could perform oviposition in the tanks, as well as the escape of molluscs, the tanks were covered with an nylon netting, fixed to four wooden slats measuring 3 m x 0.60 m, with two hinges at the upper side. The covers are opened by a mobile system consisting of a nylon rope which, when pulled out, with the aid of a pulley at the ceiling, raises the covers on a 90° angle, that remain fixed in their own structure. This mobile system was designed to facilitate management (Fig. 1C).

The temperature of the tanks is controlled by means of covers made of canvas (black on the outside and white inside) used in sheds designed for breeding chickens. These covers are suspended on the hottest months, whereas in winter they are ringed down in order to protect all the area of the tanks. These covers of canvas keep and concentrate the sunshine heat by green-house effect, allowing to the control the water temperature of the tanks between 20 to 24° C, and this is very important mainly on the coldest months. There are two types of lighting: a natural lighting, when the covers are raised, since the tanks get a direct sunshine lighting, and an artificial one, using fluorescent lamps, mainly when the covers are ringed down during the winter period or at night, when necessary (Fig. 1 D).

The water supply for the tanks derives directly from a local source, with a daily circulation, and presents 7.0 pH, approximately. The faucets of the tanks are covered with a nylon net in order to avoid the access of other organisms, such as leeches, other molluscs, insect larvae, etc., that could come together with the water and cause serious problems to the snails' breeding.

Breeding and Feeding: Specimens of *B. tenagophila* (Taim lineage), resistant to *S. mansoni*, were collected at the Ecological Station of Taim, State of Rio Grande do Sul, in 1979. Since then the molluscs have been maintained at the mollusc room, Laboratory of Schistosomiasis, Department of Parasitology, ICB/UFMG. The colony of snails used for mass scale breeding derived from the specimens maintained at that Laboratory. In order to launch the breeding in 2005, 1.200 snails were distributed into a single cement tank, and Styrofoam plates were placed on the water surface with the purpose to get the spawnings (Fig. 1 E). The plates full of spawnings were transferred to a new "nursery" tank, where the eclosion occurs and the newly born specimens are reared. When reaching a diameter of 4-5 mm, the snails were transferred from the "nursery" to the appropriate breeding tanks. The diet for the snails was similar to that used at the mollusc room pertaining to the Laboratory of Schistosomiasis, ICB/UFMG. This diet consists on fresh lettuce leaves and ration. The ration for snails was standardized by Freitas¹⁴, and it is composed of 1 kg alfafa plus 1 kg ration for mice, 500 g wheat germ, 300 g calcium carbonate, 300 mg vitamin E and 100 g powered milk. It was established that each tank would shelter 3000 specimens on average, and would be provided with a daily ration of 35.000 mg, whereas the "nursery" tanks would receive 25.000 mg of the same ration, one week before the eclosion, in order to form a layer of algae and fungi at the bottom and walls of the tanks. This is the main nutritional source for the newly-hatched snails¹⁴. With the aim to strengthen the snails' shells, 20 g calcium carbonate were added to each tank every 15 days. The above mentioned conditions were also maintained at the beginning of the current breeding carried out at the new facilities.

Mortality rate: Due to the difficulty of estimating the mortality rate of the emerging snails throughout this experiment, since they are very small, this parameter was evaluated as follows: 415 spawnings containing a total of 10.249 eggs of *B. tenagophila* (Taim lineage) were transferred to the "nursery" tank. These eggs were counted under a stereomicroscope. Thirty-days later, the number of living snails was evaluated, thus the surviving rate could be estimated and afterthat the mortality rate could also be obtained. The number of dead adult snails in the breeding tanks was weekly recorded, for a 14-month-period.

Development rhythm of B. tenagophila (Taim lineage): In order to evaluate the development rhythm of *B. tenagophila* Taim, 310 specimens with 5 mm diameter and 20 days of age, approximately, were transferred to a determinate part of the breeding tank. The area so occupied had 2 m long x 0.2 m deep x 0.6 larg. The snails were kept under the same conditions previously described, except for the amount of food daily offered (3.500 mg ration). The snails were measured on days 20, 30, 40, 50, 60 and 70 by means of a measurer consisting of a plastic net with checkered bottom on which the diameter circles between 2 to 36 mm were drawn (Fig. 1 F).

Results

1. The culture of *B. tenagophila* (Taim) in mass scale at the “Chácara Santa Inês” was set in full operation six years ago. Data showed in this work refer to the new facilities, for the period October 2010 to November 2011. Approximately, 27.000 specimens were produced in the breeding tanks for a 14-month-period. One thousand and nine hundred molluscs are monthly produced, with 12 mm diameter or more. Some aspects such as water quality, temperature control even in winter, as well as space availability were of great importance for production of the resistant lineage in mass scale throughout the year.
2. The mortality rate among adult specimens did not surpass 37% for the studied period, however these values were higher among the newly-hatched snails. From 10.294 eggs of *B. tenagophila* Taim placed into the “nursery” tank, 2.345 specimens were able to survive up to 30 days post-eclosion, and the mortality rate of this group was 77%. On the other hand, the surviving specimens transferred to the breeding tanks grew rapidly and, consequently, after sexual maturation, showed an intense reproduction in the tanks. It could be observed that in the “nursery” tank a high number of embryos hatched around the 6th day.
3. Due to innumerable difficulties for monitoring the growth rhythm of all *B. tenagophila* Taim specimens, starting from their eclosion up to the adult phase, it was established that such procedure should be performed with 310 specimens presenting 5 mm diameter, with the age grade of ± 20 days. As can be seen in Fig. 2, the growth rhythm of the molluscs evaluated up to 70 days was very uniform. At the beginning of the experiment, the snails measuring 5 mm diameter reached 8.0 ± 1.3 mm diameter, one month after eclosion. These snails attained 3mm diameter in 10 days. Completing 40 days of age, the molluscs were again evaluated, and the mean obtained for their shells was 10.8 ± 2.6 mm diameter. The values obtained for the 50-day-old snails were 13.0 ± 3.1 mm diameter. Specimens with 60 and 70 days of age

presented shells measuring 15.0 ± 1.4 mm and 17.0 ± 0.9 mm diameters, respectively. As shown in Fig. 2, the mortality rates were 2.6% and 2.0% for the periods of 20-30 and 30-40 days, respectively. It could be observed that the higher mortality rate (25.3%) occurred between the period of 40-50 days, and that no deaths occurred in the breeding tank after a 50-60-day-period. The mortality rate for the period of 60 to 70 days was 6.8%. After 70 days the accumulated mortality rate was estimated in 33.5%.

Discussion

Breeding of *Biomphalaria tenagophila* (Taim lineage) was successfully maintained under laboratory conditions for more than 27 years. The demand for specimens in various experiments, which were performed in recent years, required thousands of individuals in experiments carried out both in field and laboratory. Thus, the need to develop a standard technique, ideal for breeding that lineage in mass scale, emerged. Although some efficient techniques for breeding *B. glabrata* under laboratory conditions have been already described^{23,14}, our technique was performed under semi-open environment, using *B. tenagophila* lineage, and we selected some mentioned procedures by those authors as a basis for our study. The facilities described in the present work were very different from those used under laboratory conditions. The *B. tenagophila* snails were reared in big cement tanks, with their bottom covered with a mixture of earth and calcium carbonate. This system was proved to be highly efficient and of low cost for the production of snails in large scale.

The temperature control is a crucial point for the good development of aquatic snails¹⁴. Freitas¹⁴ reports that during the standardization of the technique for breeding *B. glabrata* the glass aquaria were kept in a room with a constant temperature around 25° C, and in winter the heaters were activated to avoid a sudden drop of the temperature. At the beginning, this system for temperature control in the shed was practically impossible due to its large extension, as well as for the high consumption of electric energy required by the heaters used. Therefore, the use of black canvas covers was an alternative developed in order to control the temperature (between 20 -24° C), mainly in winter. The use of this system allowed stabilization of the water temperature and presented as a result a good development and reproductive performance of the snails, even in winter, without electric energy consumption.

In the present study, it was established that each breeding tank would receive 3000 snails on average, as a standard procedure. In this manner, the super population effect was avoided, the so called “crowding effect”. This occurs when a determined population reaches the critical number of individuals, that is, a higher density of molluscs for the same water quantity. This may lead to a decrease in productivity, as well as an increase in the mortality rates^{9,4,2}. Coelho et al¹⁰ verified, by means of the caption technique of radioisotope (⁵⁹Fe), that an increase in the populational density corresponded to a decrease in the incorporation capacity of ⁵⁹Fe. The same authors also observed a decrease in the snails’ growth, as well as an increase in the mortality rate of the snails in the aquaria with high populational densities.

As far as the breeding techniques are concerned, an adequate supply of food is one of the most important factors for regulation of the snails’ growth rates. At the beginning of our work, when the population reached approximately 3000 snails, these snails received 25.000 mg of ration plus a supplement of lettuce *ad libitum* every two weeks, that is, in sufficient quantity to be consumed on the day, thus avoiding brewing water and, consequently, the snails’ death. Nevertheless, it was verified that the amount of food offered was not sufficient, since the snails measuring 5 mm diameter showed a very slow growth rhythm. After this fact, each breeding tank was supplied with 35.000 mg ration every day, plus fresh lettuce as a supplement, and it was consequently observed that the snails attained a marked development rhythm. However, the diameter of the mollusc shells was not recorded at that occasion. The same behavior was noted in studies performed with *B. glabrata*¹⁴. The increase from 1.4 mg/snail/day to 11.7 mg/day in the experiments resulted in a sudden high growth rate. The snails measuring 5.6 mm ± 1.8mm diameter, with 1 month of age started reaching 11.3 mm diameter. The emerging snails showed a particular feature, since at this development stage they did not eat ration, but they feed on fungi and algae formed at the bottom of the aquaria. Previous studies demonstrated that by means of this method it is possible to obtain more than 90% of surviving snails in the “nursery” glass aquaria¹⁴. Although this procedure was also performed by our research group, we detected a mortality rate of 70% among the emerging snails in the so called “nursery” tank. Nevertheless, these rates are in accordance with the surviving rate of different aquatic organisms artificially reared, such as fingerlings in pisciculture, and other molluscs in commercial breeding, such as *escargots* and oysters. It is important to remark that our system is considered semi-natural, different from the laboratory environment, with well controlled variables. It is well known that in nature the newly-born organisms from different animals’ orders and species present a very high mortality rate under natural conditions, with a very low rate of survivors up to the adult phase. The large number

of animals produced acts as a compensatory factor for mortality, that allows the maintenance of the species at the natural environment, this occurring mainly with invertebrates. Various authors mention that one of the most critical points concerning the breeding of molluscs is the development of newly-hatched snails, since the highest mortality rate occurs at this stage^{3,30,12,22}.

In relation to the growth rhythm of *B. tenagophila*, which is poorly known, it was verified that *B. tenagophila* (Taim lineage) presented a good growth rhythm in the breeding tanks, since after 70 days the specimens reached 17,0 mm diameter on average. Although these data were obtained with a small population, constituted of 310 individuals, the values obtained were very similar to those observed in the other tanks. Studies conducted with *B. glabrata* mention that 30-day-old individuals are able to reach 17.0 mm diameter on average, increasing to 23.0 mm diameter after 60 days¹⁴. The values related to *B. glabrata*, as mentioned by the same author, were higher than other ones reported by various researchers, and all the mentioned works by them were carried out under laboratory conditions, with very well controlled variables^{8,24}.

The present study presents an efficient methodology for breeding *Biomphalaria* in mass scale with economical facilities, low cost of production and ease of maintenance.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank CNPq, FAPEMIG, FIOCRUZ and SUCEN, Brazil, for financial support; Vera de Paula Ribeiro for translating our manuscript.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Florence Mara Rosa participated in the preparation of the project for the new facilities related to the mollusc room; helped with the formulation and control of feeding molluscs; participated in all steps to establish the basic procedures for the mollusc breeding; participated in the experimental design to assess the growth and mortality rates of the snails, and participated in this article writing as well.

Daisymara P. Almeida Marques participated actively in the assembly and planning of the new breeding facilities; participated in the discussion and execution of the experiments and helped in this article writing.

Engels Maciel is the owner of the realty where the mollusc room was installed. As a retired Engineer in the research area of the “Companhia Vale do Rio Doce”; he had an enthusiastic

and fundamental participation in the assembly of the breeding planning. His suggestions based on his experience of Engineering and previous researches constituted the central focus of the improved model.

Josiane Maria Couto, student of Biology, participated actively in the process of assembly and maintenance of the breeding tanks, and contributed with important suggestions for the improvement of the methodology.

Deborah A. Negrão-Correa, since the beginning of the breeding, she has posted valuable suggestions for improving the breeding process, leveraging her extensive experience in maintenance of *Biomphalaria* in laboratory; she provided us with the specimens used in the beginning of this breeding process; participated in the planning of the experiments and in this article writing.

Horácio M. Santana Teles participated in the assembly of the facilities related to the tanks and the mollusc room. His great experience as Malacologist at SUCEN was very important for improvement of the breeding system of *Biomphalaria*; participated in the preparation of the experiments, as well as in the discussion of the results.

João Batista dos Santos worked intensively throughout all stages for assembly of the breeding system. His dedication was of fundamental importance for the success of the model designed; presented valuable suggestions for improvement of management and efficiency of the breeding process.

Paulo Marcos Zech Coelho is the Coordinator of this project, and participated in all stages of the model development, as well as in this paper writing.

RESUMO

Criação em larga escala de *Biomphalaria tenagophila*

Foi desenvolvido um método eficiente de criação em larga escala de *Biomphalaria tenagophila* (linhagem Taim/RS) durante o período de 2005-2010. Foi concebida uma instalação que consiste de quatro tanques de alvenaria (9,4x0,6x0,22) com fundos recobertos por uma mistura constituída de terra vermelha esterilizada e carbonato de cálcio. Foi padronizado que cada tanque de criação conteria em média 3.000 exemplares e receberia diariamente 35.000 mg de ração e alfaca como complemento. O desenvolvimento de um sistema de aquecimento por efeito estufa constituído de lonas escuras móveis permitiu controlar a temperatura entre 20 a 24°C, sistema essencial principalmente nos meses mais frios. Durante o período de 14 meses foram produzidos aproximadamente 27.000 exemplares com diâmetros superiores a 12 mm. As taxas de mortalidade dos caramujos recém-eclodidos e

adultos foram de 77% e 37%, respectivamente. O acompanhamento do ritmo de crescimento de 310 indivíduos de *B. tenagophila* demonstrou que caramujos com 70 dias de idade alcançaram em média $17,0 \pm 0,9$ mm de diâmetro. As taxas de mortalidade e o desempenho de crescimento de caramujos do gênero *B. tenagophila* podem ser considerados altamente satisfatórios, comparando-se com os resultados da literatura realizados com espécies do gênero *Biomphalaria* em condições controladas de laboratório.

REFERENCES

1. Barbosa L, Caldeira RL, Carvalho OS, Vidigal TH, Janotti-passos LK, Coelho PMZ. Resistance to *Schistosoma mansoni* by transplantation of APO *Biomphalaria tenagophila*. Parasite Immun., 286: 209-212, 2006.
2. Barbosa, FS, Barbosa, CS. Cultivo em massa de *Biomphalaria straminea*. In: Barbosa, FS (Org.). Tópicos em Malacologia Médica, Rio de Janeiro: Fiocruz 1995. 297-299.
3. Barlow, CH, Muench, H. Life span and monthly mortality rate of *Bulinus truncatus* and *Planorbis boissyi* the intermediate hosts of schistosomiasis in Egypt. J. Parasitol, 37: 165-173, 195.
4. Berrie AD, Visser, SA. Investigations of a growth-inhibiting substance affecting a natural population of fresh water snails. Physiol. Zool, 36(2): 167-173, 1963.
5. Bezerra FSM, Nogueira-machado JA, Chaves MM, Martins RL, Coelho PMZ. Quantification of the Number and Phagocytary Activity of Hemocytes of Resistant and Susceptible Lineages of *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria tenagophila* infected with *Schistosoma mansoni*. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 39: 17-201, 1997.
6. Bezerra FSM, Nogueira-machado JA, Martins-Souza RL, Chaves MM, Corrêa RF Coelho PMZ. Effect of gamma radiation on the activity of hemocytes and on the course of *Schistosoma mansoni* infection in resistant *Biomphalaria tenagophila* snails. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 98:73-75, 2003.
7. Borda CE, Pellegrino J. Susceptibility of *Biomphalaria tenagophila* and *Biomphalaria glabrata* to 2 lineages of *Schistosoma mansoni*. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 18(3): 157-164, 1976.
8. Brumpt E. Observations biologiques diverses concernant *Planorbis (Australorbis) glabratus* hôte intermédiaire de *Schistosoma mansoni*. Ann. Parasitol., 18 : 9-45, 1941.
9. Chernin E, Michelson, EH. Studies on the biological control of Schistosome-bearing snails. IV- Further observations on the effects of crowding on growth and fecundity in *Australorbis glabratus*. Am. J. Hyg., 65: 71-80, 1957
10. Coelho PM, Gazzinelli G, Pellegrino J, Pereira LH. Standardization on Fe-59 uptake method, in *B. glabrata* to study population density effect. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 15(16): 417-420, 1973.

11. Coelho PMZ, Rosa FM, Maciel E, Negrão-Corrêa D, Carvalho O, Caldeira R, Jannotti-Passos LK, Moreira LA, Oliveira GC, Teles HMS. Transmission control of schistosomiasis mansoni by introduction of a resistant lineage of *Biomphalaria tenagophila* in areas where transmission is maintained by this species. *Acta Trop.*, 108: 245-248 2008.
12. Davis GM, Iwamoto, S. Factors influencing productivity of culture of *Oncomelania hupensis nosophora*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 18 (4): 629-637, 1969
13. Freitas JR, Boschi, MB, Santos, MBL. Suscetibilidade de “híbridos” de *Biomphalaria tenagophila* à cepa LE (BH) do *Schistosoma mansoni*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 1: 6-12, 1985.
14. Freitas JR. Ritmo de crescimento da *Biomphalaria glabrata* (Say,1818), padronização da técnica de criação.1973. 108p. Tese (Doutorado em Parasitologia), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
15. Kawazoe U. Alguns aspectos da biologia de *Biomphalaria glabrata* (Say,1818) e *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny,1835) Pulmonata, planorbidae). I- Duração do período embrionário. *Rev. Saúde Púb. S. Paulo*, 10: 57-64, 1976.
16. Kawazoe, U. Alguns aspectos da biologia de *Biomphalaria glabrata* (Say,1818) e *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny,1835) Pulmonata, planorbidae). II- Fecundidade e Fertilidade. *Rev. Saúde Púb. S. Paulo*, 10: 47-64, 1977.
17. Martins-Souza RL, Pereira CA, Coelho PMZ, Negrão-Corrêa D. Silica treatment increases the susceptibility of the Cabo Frio lineage of *Biomphalaria tenagophila* to *Schistosoma mansoni* infection but does not alter the natural resistance of the Taim lineage. *Parasitol. Res.*, 91: 500-507, 2003.
18. Martins-Souza RL, Pereira CA, Rodrigues L, Araujo ES, Coelho PM, Côrrea A Jr, Negrão-Corrêa, D. Participation of N- acetyl D- glucosamine carbohydrate moieties in the recognition of *S. mansoni* sporocysts by haemocytes of *Biomphalaria tenagophila*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 106 (7): 884-891, 2011.
19. Mattos AC, Martins-Souza RL, Kusel, JR, Coelho PM. Interaction between primary and secondary sporocysts of *Schistosoma mansoni* and the internal defence system of *Biomphalaria* resistant and susceptible to the parasite. Intermediate hosts. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 106: 424-432, 2011.

20. Negrão-corrêa D, Pereira, CA, Rosa FM, Martins-Souza RL, Andrade ZA, Coelho PMZ. Molluscan response to parasite: *Biomphalaria* and *Schistosoma mansoni* interaction. ISJ, 4: 101-111, 2007.
21. Paraense WL. Autofecundação e fecundação cruzada em *Australorbis glabratus*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 53: 277- 284 1955.
22. Pellegrino J, Gonçalves, M.G.R. A simple method for collecting egg clutches of *Biomphalaria glabrata* (*Australorbis glabratus*) and for rearing newly hatched snails. J. Parasitol, 51(6): 1014, 1965.
23. Pellegrino, J, Katz, N. Experimental chemotherapy of schistosomiasis mansoni. Adv Parasitol, 6: 233-90 1968.
24. Perlowagora SA. Studies on the biology of *Australorbis glabratus*, schistosome bearing Brazilian snail. Rev. Bras. Malariol. D. Trop., 10(4): 459-531,1958.
25. Rosa FM, Godard ALB, Azevedo V, Coelho, PMZ. *Biomphalaria tenagophila*: dominant character of the resistance to *Schistosoma mansoni* and descendants of cross-breeding between resistant (Taim, RS) and susceptible (Joinville, SC) lineages. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 100: 19-23, 2005.
26. Sandt DG, Bruce JI, Radke, MG. A system for man producing the snail *Australorbis glabratus* and cercariae of *Schistosoma mansoni*. J. Parasitol, 51(6): 1012-1013, 1965.
27. Santos MBL, Freitas JR, Correia MCR.; Coelho,PMZ. 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: 281-286, 1979.
28. Silva RE, Melo AL, Pereira LH. Susceptibility of *Biomphalaria tenagophila* and *Biomphalaria glabrata* from a same region to 2 *Schistosoma mansoni* lineage. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 36(5): 409-15, 1994.
29. Souza CP, Araújo, N, Janotti-Passos, LK, Guimarães, CT. Production of *Schistosoma mansoni* cercariae by *B. glabrata* from a focus in Belo Horizonte, M.G. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 36(6): 485-489, 1994.
30. Standen OD. Some observation upon maintenance of *Australorbis glabrata* in the laboratory. Ann. Trop. Med. Parasitol, 45(1): 80-83, 1951.

31. Teles HMS, Ferreira CS, Carvalho ME, Lima VR, Zacharias, F. Schistosomiasis mansoni in Bananal (State of São Paulo, Brazil). II. Intermediate hosts. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 97: 37-41, 2002.

LEGENDS

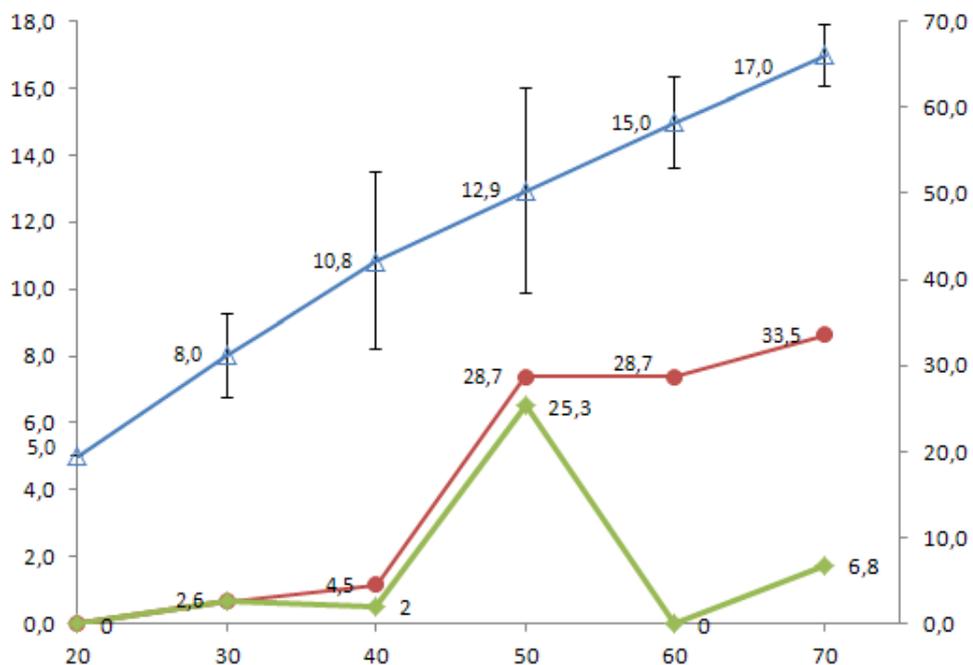
Fig 1: Breeding of *B. tenagophila* in mass scale at the “Chácara Santa Inês”, Bananal/SP. A: New facilities for breeding of *B. tenagophila* (Taim lineage) (inside visualization). **B:** Obs.: Breeding of *B. tenagophila* do Taim (outside visualization). (*) The canvas is black on the outside and white inside. **C:** Photograph of the new facilities for breeding *B. tenagophila* (Taim lineage) in mass scale, showing the system for opening and raising the covers of the breeding tanks and showing protection for the tanks by means of black canvas for temperature maintenance through greenhouse effect. **D:** The former facilities for breeding *B. tenagophila* (Taim lineage), showing protection for the tanks by means of black canvas for temperature maintenance through greenhouse effect. **E:** Photograph of one of the tanks for breeding *B. tenagophila* (Taim lineage) showing the snails, the bottom covered with earth, and Styrofoam plates for catching the spawnings. **F:** Measurer used to assess the growth rhythm of *B. tenagophila* (Taim lineage).

Fig. 2: Graph showing the growth and mortality rates of *B. tenagophila* (Taim lineage) in the breeding tanks, Bananal/SP. Title Axis: X₁: Mean diameter of the shells (mm), X₂: Mortality rate (%), Y: Age (Days). — Mean growth, — Accumulated mortality rate, — Mortality rate per period.

FIGURE 1 (A, B, C, D, E e F)



FIGURE 2



9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amaral RS, Tauil PL, Lima DD, Engels D. An analysis of the impact of the Schistosomiasis Control Programme in Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 2006 Jun. 26; 101 (Suppl.1): 79-85.

Andrade RM, Campos LGR. Infestação natural de *Biomphalaria straminea* por oligoquetas do gênero *Chaetogaster*. Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop., 1969; 21: 27-36.

Andrade RM, Antunes CM. Combate biológico: *Tilapia melanopleura* Dumeril versus *Biomphalaria glabrata* (Say), under laboratory conditions. Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop., 1969 Jan-Mar.; 21 (1): 49-58.

Arantes A. Onze casos autóctones de esquistossomose em Santos. Bol. Soc. Med. Cir. S. Paulo, 1924; 7: 64-65.

Armúa de Reyes CA, Estévez AL. Predation on *Biomphalaria* sp. (Mollusca: *Planorbidae*) by three species of the genus *Belostoma* (Heteroptera: *Belostomatidae*). Braz. J. Biol., 2006 Nov.; 66 (4): 1033-5.

Barbosa FS, Dobbin Junior JE. Resistência de *Australorbis glabratus* à dessecação em condições naturais. Publ. Avulsas Inst. Aggeu Magalhães, 1952a; 1 (11): 145-48.

Barbosa FS. Some seasonal and climatic factors influencing the life-cycle of *Australorbis glabratus* and *Tropicorbis centimentralis* in north-eastern Brazil. Geneva: World Health Organ. (Biology Ecology, 4). 1956.

Barbosa FS, Olivier L. Studies on the snail vectors of bilharziasis mansoni in north-eastern Brazil. Bull.of the World Health Organ., 1958; 18; 895-908.

Barbosa FS. Aspects of the ecology of the intermediate hosts of *Schistosoma mansoni* interfering with the transmission of bilharziasis in north-eastern Brazil. In: Wolsternholme G. E, O' Coonor M, editores. Ciba Foundation Symposium Bilharziasis. 1ª Ed. Londres: J. & A. Churchill; 1962. P. 23-35.

Barbosa FS. Epidemiologia. In: Cunha, AS, editor. Esquistossomose mansoni. 1ª ed. São Paulo: Sarvier/USP; 1970. P. 31-59.

Barbosa FS. Possible competitive displacement and evidence of hybridization between two Brazilian species of planorbid snails. *Malacologia*, 1973; 14: 401-8.

Barbosa FS, Costa DP, Arruda F. Competitive interactions between species of fresh-water snails I. Laboratory I. Comparative survival of *Biomphalaria glabrata* and *B. straminea* kept out of water. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1985; 80: 155-57.

Barbosa FS, Barbosa CS. The Bioecology of Snail Vectors for Schistosomiasis in Brazil. *Cad. saúde pública*, Rio de Janeiro, 1994 abr-jun.; 10 (2): 200-9.

Barbosa CS, Silva CB, Barbosa FS. Esquistossomose: reprodução e expansão da endemia no Estado de Pernambuco no Brasil. *Rev. Saúde Pública*, 1996 Dec.; (30 (3): 609-16.

Barbosa CS. Epidemiology and Anthropology: an Integrated Approach Dealing with Bio-Socio-Cultural Aspects as Strategy for the Control of Endemic Diseases. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1998 Aug.; 93 (Suppl.1): 59-62.

Barbosa CS, Pieri OS, Silva CB, Barbosa FS. Ecoepidemiologia da esquistossomose urbana na ilha de Itamaracá, Estado de Pernambuco. *Rev. Saúde Pública*, 2000 ago; 34 (4): 337-41.

Barbosa L. Transferência do órgão hematopoiético de *Biomphalaria tenagophila* do Taim para *Biomphalaria tenagophila* de Cabo Frio [Dissertação]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2001.

Barbosa L, Caldeira RL, Carvalho OS, Vidigal TH, Jannotti-Passos LK, Coelho PMZ. Resistance to *Schistosoma mansoni* by transplantation of APO *Biomphalaria tenagophila*. *Parasite Immunol*, 2006 May.; 28 (5): 209-12.

Barbosa CS, Favre TC, Amaral RS, Pieri OS. Epidemiologia e Controle da Esquistossomose Mansoni. In: Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HL, organizadores. *Schistosoma mansoni &*

Esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2008. P. 967-1008.

Barros-Battesti DM, Arzua M, Bechara GH. Carrapatos de Importância Médico-Veterinária da região Neotropical; Um guia ilustrado para identificação de espécies. São Paulo: illust; 2006. 223p.

Bayne CJ. Successful parasitism of vector snail: *Biomphalaria glabrata* by the human blood fluke (trematode) *Schistosoma mansoni*: A 2009 assessment. Mol. Biochem. Parasitol., 2009 May.;165 (1): 8-18.

Bezerra FSM, Nogueira-Machado JA, Chaves MM, Martins-Souza RL, Coelho PMZ. Quantification of the Number and Phagocytary Activity of Hemocytes of Resistant and Susceptible Strains of *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria tenagophila* infected with *Schistosoma mansoni*. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 1997 Jul-Ago.; 39 (4): 197-201.

Bezerra FSM, Nogueira-Machado JA, Martins-Souza RL, Chaves MM, Corrêa RF, Coelho P MZ. Effect of gamma radiation on the activity of hemocytes and on the course of *Schistosoma mansoni* infection in resistant *Biomphalaria tenagophila* snails. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2003 Jan; 98 (1): 73-75.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica: diretrizes: Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose (PCE). 2. ed. Brasília: Editora do MS, 2008. 178p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

BEPA, Bol. epidemiol. paul. (Online) [periódico na Internet]. Estado de São Paulo implanta Semana de Esquistossomose. Publicação mensal sobre agravos à saúde pública. 2009; 6 (64). ISSN 1806-4272.

Brooker S, Utzinger J. Integrated disease mapping in a polyparasitic world. Geospatial Health, 2007 May.; 1 (2): 141-46.

Brumpt E. Observations biologiques diverses concernant *Planorbis (Australorbis) glabratus* hôte intermédiaire de *Schistosoma mansoni*. Ann. Parasitol., 1941;18 9-45.

Caldeira RL, Jannotti-Passos LK, Carvalho OS. Molecular epidemiology of Brazilian *Biomphalaria*: a review of the identification of species and detection of infected snails. Acta Trop. 2009 Jul.; 111 (1): 6-11.

Caldeira RL, Teodoro MT, Gomes MFB, Carvalho, OS. Preliminary studies investigating the occurrence of *Biomphalaria cousini* in Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2010 July.; 105 (4): 485-87.

Carvalho OS, Souza CP, Katz N. Primeiro encontro de *Biomphalaria tenagophila* (d'Orbigny, 1835) naturalmente infectada com *S. mansoni*, em Itajubá, sul do Estado de Minas Gerais, Brasil. Rev Saude Publica São Paulo, 1985a fev.; 19 (1): 88-91.

Carvalho OS, Nunes IM, Caldeira RL. First report of *Biomphalaria glabrata* in state of Rio Grande do Sul (Brazil). Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 1998 Jan-Feb.; 93 (1): 39-40.

Carvalho OS (Org.), Jannotti-Passos LK, Mendonça CLGF, Cardose PCM, Caldeira RL. Moluscos Brasileiros de Importância Médica. Belo Horizonte: Fiocruz/Centro de Pesquisas René Rachou, 2008. 86p. (Série Esquistossomose, 10).

Carvalho OS, Scholte RGC, Guimarães RJPS, Amaral RS, Dutra LV, Oliveira GC, Massara CL, Enk MJ. The Estrada Real project and endemic disease: the case of schistosomiasis, geoprocessing and tourism. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 2010 July; 105 (4): 532-36.

Chaia G. Técnica para concentração de miracídeos. Rev. Bras. Malar. Doenç. Trop., 1956; 8: 355-7.

Chieffi PP. Susceptibilidade à infecção por *Schistosoma mansoni* de cepas de *Biomphalaria tenagophila* originárias dos Estados de São Paulo e Paraná. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 1975; 17:92-96.

Chieffi PP, Waldman EA. Aspectos particulares do comportamento epidemiológico da Esquistossomose Mansônica no Estado de São Paulo, Brasil. Cad. Saude Publica, Rio de Janeiro, 1988 jul-set.; 4 (3): 257-275.

Chitsulo L, Engels D, Montresor A, Saviolo L. The global status of schistosomiasis and its control. Acta Trop., 2000 Oct. 23; 77 (1): 41-51.

Coelho MV. Aspectos do desenvolvimento de formas larvais de *Schistosoma mansoni* em *Australorbis nigricans*. Rev. Bras. de Biol., 1957; 17: 235-37.

Coelho PMZ, Boson FCB, Gerken SE. Potencialidade de predação à *Biomphalaria glabrata*: (Say, 1818) por duas espécies de quelônios sul-americanos: *Platemys spixii* (Duméril e Dibron, 1935) e *Chrysemys (Trachemys) dorbigni* (Duméril e Dibron, 1935). Ciência e cult., 1975; 27: 301-303.

Coelho PMZ, Gerken ES, Freitas JR. Avaliação de populações de planorbídeos em habitats naturais, pelo método de perfuração da concha. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 1986 mar-abr.; 28 (2): 74-79.

Coelho PMZ, Carvalho OS, Andrade ZA, Martins-Souza RL, Rosa FM, Barbosa L, Pereira C AJ, Caldeira RL, Jannotti-Passos LK, Godard ALB, Moreira LA, Oliveira GC, Franco GR, Teles HMS, Negrão-Corrêa DA. *Biomphalaria tenagophila/Schistosoma mansoni* interaction: Current Knowledge and Perspectives for its Application on the Control of Schistosomiasis mansoni. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 2004; 99 (5 Suppl. 1):109-111.

Coelho JR, BezerraFS. Compatibility of *Biomphalaria tenagophila* with *Schistosoma mansoni*: a study of homologous plasma transference. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 2006 Feb.; 101(1):111-2.

Coelho PMZ, Andrade ZA, Borges CMC, Ribeiro F, Barbosa L. Evolução de *Schistosoma mansoni* no hospedeiro intermediário. In: Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HL, organizadores. *Schistosoma mansoni* & Esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2008. P. 149-60.

Coelho PMZ, Rosa FM, Maciel E, Negrão-Corrêa DA, Carvalho OS, Caldeira RL, Jannotti-Passos LK, Moreira L, Oliveira RG, Teles HMS. Transmission control of schistosomiasis *mansoni* by introduction of a resistant strain of *Biomphalaria tenagophila* in areas where transmission is maintained by this species. *Acta Trop.*, 2008 Nov-Dec; 108 (2-3): 245-8.

Cooper AL, Larson SE, Lewis FA. Male reproductive success of *Schistosoma mansoni* infected *Biomphalaria glabrata* snails. *J. Parasitol.*, 1996 Jun.; 82 (3): 428-31.

Corrêa MCR, Coelho PMZ, Freitas JR. Susceptibilidade de linhagens de *Biomphalaria tenagophila* e *B. glabrata* a duas cepas do *Schistosoma mansoni* (LE- Belo Horizonte, MG e SJ- São José dos Campos, SP). *Rev. Inst. Med.Trop. São Paulo*, 1979; 21: 72-76.

Costa MJFS, Gault CE, Confalonieri UEC. Comparative study of the fecundity and fertility of *B. glabrata* (Say,1818) and *B. straminea* (Dunker,1848) in laboratory through self-fertilization and cross- fertilization. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 2004 May-June; 46 (3): 157-63.

Coura, JR, Amaral RS. Epidemiological and control aspects of Schistosomiasis in Brazilian Endemic Areas. *Mem. Inst.Oswaldo Cruz*, 2004 Oct. 13; 99 (5 Suppl. 1):13-19.

Crews AE, Yoshino TP. *Schistosoma mansoni*: Effect of infection on reproduction and gonadal growth in *Biomphalaria glabrata*. *Exp. Parasitol.*, 1989 Apr.; 68 (3): 326-34.

Davison Angus, Blackie RLE, Scothern GP. DNA barcoding of stylommatophoran land snails: a test of existing sequences. *Mol. Ecol. Resour.*, 2009 June.; 9 (4): 1092-1101.

De Jong RJ, Emery AM, Adema C. The mitochondrial genome of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda: Basommatophora), intermediate host of *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.*, 2004 Oct; 90 (5): 991-97.

De Salle R, Egan MG, Siddall M. The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2005 Oct. 29; 360 (1462): 1905-16.

Eduardo M B de Paula. Avaliação da Esquistossomose no Estado de São Paulo. Documento técnico/Relatório de Avaliação. Secretaria do Estado da Saúde, Coordenadoria de Controle de Doenças, Centro de Vigilância Epidemiológica, Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. 2008. 59p.

Engels D, Chistsulo L, Montresor A, Savioli L. The global epidemiological situation of Schistosomiasis and new approaches to control and research. *Acta Trop.*, 2002 jun.; (108): 245-248. May.; 82 (2): 139-46.

Enk MJ, Lustosa Lima AC, Drummond SC, Shall VT, Coelho PMZ. The impact of the number of stool samples on the prevalence, the infection intensity and the distribution with *Schistosoma mansoni* among a population in an area of low transmission. *Acta Trop.*, 2008; 108:222-228.

Faust EC, Hoffman WA. Studies on schistosomiasis mansoni in Puerto Rico. I – The extramammalian phases on lyfe-cycle. *PR J Public Health Trop. Med.*, 1934; 10:47.

Fernandez M A, Thiengo SC. Susceptibility of *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1948) from Serra da Mesa Dam, Goiás, Brazil to infection with three strains of *Schistosoma mansoni* Sambom, 1907. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 2002 Oct.; 97 (Suppl.1): 59-60.

Fernandez MA, Thiengo SC. Suscetibility of *Biomphalaria amazonica* and *Biomphalaria occidentalis* from Manso dam, MT, Brazil, to infection with three strains of *Schistosoma mansoni*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 2006 June.; 101(Suppl.1): 235-7.

Figueiredo CCSB. Interações entre espécies de *Biomphalaria*, moluscos transmissores da esquistossomose no nordeste do Brasil [Dissertação]. Paraíba: Universidade Federal da Paraíba; 1989.

Freitas JR. Ritmo de crescimento da *Biomphalaria glabrata* (Say,1818), padronização da técnica de criação [Tese]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 1973.

Freitas JR, Boschi MB, Santos MB. Susceptibility of *Biomphalaria tenagophila* hybrids to the LE (BH) strain of *Schistosoma mansoni*. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, São Paulo, 1985 Jan-Feb; 27 (1): 6-12.

Giovanelli A, Marcus VV, Coelho da Silva CLPA. Interaction between the intermediate host of schistosomes in Brazil, *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) and a possible competitor, *Melanooides tuberculata* (Müller, 1774): A field study. J.f Molluscan Stud., 2005; 71 (1): 7-13.

Glasser CM. Schistosomiasis control in the State of São Paulo. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 1995 Mar-Apr; 90 (2): 307-9.

Gonçalves MGR, Pellegrino J. Predatory activity of *Helobdella triserialis* (Blanchard, 1849) upon *Biomphalaria glabrata* under laboratory conditions. J. Parasitol., 1967; 53: 30.

Guimarães CT, Souza CP, Consoli RAGB, Soares DM. Controle biológico: *Helobdella triserialis lineata* (Hirudinea: Glossiphonidae) sobre *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila* (Mollusca: Planorbidae), em laboratório. Rev. Saúde Públ., São Paulo, 1984; 18: 476-86.

Guimarães MCA, Muniz C, Takahashi FY, Ohlweiler FP, Kawano T, Natal D. The effects of the experimental infection from a focus of transmission of *Schistosoma mansoni* in a population of *Biomphalaria tenagophila* (D'Orbigny, 1835) in the region of "Vale do Ribeira de Iguapé", Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 2010 Mar-Apr.; 52 (2): 101-5.

Guimarães RJPS, Freitas CC, Dutra LV, Scholte RGC, Martins-Bedé FT, Fonseca FR, Amaral RS, Drummond CAF, Oliveira GC, Carvalho OS. A geoprocessing approach for studying and controlling schistosomiasis in the state of Minas Gerais, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 2010 July; 105 (4): 524-31.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. IBGE cidades. Bananal/SP. Censo 2010, Primeiros resultados. Brasília: IBGE, 2011. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>>. Acesso em: 25 jan. 2011.

Jannotti-Passos LK. Sequenciamento do DNA mitocondrial de *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835) (Mollusca: Gastropoda) [Tese]. Belo Horizonte: Instituto Oswaldo Cruz; 2007.

Jannotti-Passos LK, Caldeira RL, Carvalho OS. Técnicas utilizadas no estudo dos moluscos do gênero *Biomphalaria* e na manutenção do ciclo de *Schistosoma mansoni*. In: Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HL, organizadores. *Schistosoma mansoni* & Esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2008. P. 531-44.

Kane R A, Rollinson, D. Repetitive sequences in the ribosomal DNA internal transcribed spacer of *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma intercalatum* and *Schistosoma mattheii*. Mol. Biochem. Parasitol., 1994; 63: 153-156.

Katz N, Peixoto SV. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop, 2000 mai-jun.; 33 (3): 303-308.

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

Kawazoe U. Alguns aspectos da biologia de *Biomphalaria glabrata* (SAY, 1818) e *Biomphalaria tenagophila* (D'ORBIGNY, 1835) (PULMONATA, *PLANORBIDAE*). II — Fecundidade e Fertilidade. Rev. Saúde púb. São. Paulo, 1977; 11: 47-64.

King CH. Parasites and poverty: The case of Schistosomiasis. Acta Trop., 2010 Feb.; 113 (2): 95-104.

Lenzi HL, Juberg AD, Coelho PMZ, Lenzi JA. Migração e Desenvolvimento de *Schistosoma mansoni* no Hospedeiro Definitivo. In: In: Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HL, organizadores. *Schistosoma mansoni* & Esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2008. P. 87-146.

Madsen H. Ecological studies on the intermediate host snails and the relevance to schistosomiasis control. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 1990; 87 (Suppl. 4): 249-53.

Magalhães LA et al Estudo da dinâmica populacional de *Biomphalaria glabrata* e *B. tenagophila*. I — Estudo comparativo da postura e do desenvolvimento das desovas de populações de *Biomphalaria glabrata* e *B. tenagophila*. Nota prévia. Rev. paul. Med., 1968; 72:268-9.

Magalhães LA, Carvalho JF. Estudo de postura de duas populações de planorbídeos. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 1969; 3: 245-247.

Magalhães LA, De Lucca O. Determinação do período de desenvolvimento e da viabilidade das desovas de duas populações de *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria tenagophila* (Mollusca, Planorbidae). Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 1971; 5:307-313.

Malek EA. Snails hosts of Schistosomiasis and Other Snail-transmitted Diseases in Tropical America. Manual Pan American Health Organization, Scientific Publication nº 478, 325p. 1985.

Marques, AC. Migrações internas e as grandes endemias. Rev Bras Malariol Doencas Trop, 1979; 31: 137-58.

Martins-Souza RL, Pereira CA, Coelho PMZ, Negrão-Corrêa DA. Silica treatment increases the susceptibility of the Cabo Frio strain of *Biomphalaria tenagophila* to *Schistosoma mansoni* infection but does not alter the natural resistance of the Taim strain. Parasitol. Res., 2003 Dec; 91 (6): 500-07.

Martins-Souza RL. Caracterização fenotípica e funcional de hemócitos circulantes de *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria tenagophila* linhagens resistentes susceptíveis durante infecção por *Schistosoma mansoni* [Tese]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2006.

Mattos ACA, Martins-Souza RL, Kusel JR, Coelho PMZ. Interaction between primary and secondary sporocysts of *Schistosoma mansoni* and the internal defence system of *Biomphalaria* resistant and susceptible to the parasite. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 2011 Jun.; 106(4): 424-32.

Melo AL, Pereira LH. On the findings of *Biomphalaria tenagophila* naturally infected with *Schistosoma mansoni* in the state of Minas Gerais, Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 1985; 27 (2): 99-101.

Meuleman EA. Host-parasite interrelationships between the freshwater pulmonate *Biomphalaria pfeifferi* and the trematode *Schistosoma mansoni*. Neth. J. Zool., 1971; 22 (4): 355-427.

Milward de Andrade R.; Guimarães CT. Controle biológico de *Biomphalaria glabrata* (Say,1818) após a introdução de *Pomacea haustum* (Reeve,1856) em Calciolândia, MG. Ciência e cult., 1977; 19: 786.

Milward de Andrade R.; Carvalho OS. Colonização de *Pomacea haustum* (Reeve, 1856) em localidade com esquistossomose mansoni: Baldim, MG (Brasil). (Prosobranchia, Pillidae). Rev. Saúde Públ., São Paulo, 1979; 13: 92-107.

Monteiro W, Dias BFS. Estratégias reprodutivas em *Biomphalaria* (Mollusca: Planorbidae). Ciênc. e Cult., 1989; 41: 1051-4.

Monteiro W, Kawano T. Investimento na função masculina em *Biomphalaria tenagophila* (ORBIGNY) (MOLLUSCA, PLANORBIDAE) avaliado pelo número de espermatozoides. Rev Bras Biol, 1998 nov.; 58 (3): 481-490.

Moraes J, Silva MP, Ohlweiler FP, Kawano T. *Schistosoma mansoni* and other larval trematodes in *Biomphalaria tenagophila* (Planorbidae) from Guarulhos, São Paulo State, Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 2009; 51 (2): 77-82.

National Center for Biotechnology Information<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>.U.S. National Library of Medicine<<http://www.nlm.nih.gov/>>. Bacterial Genome Submission Guide. Bethesda: NCBI/NLM, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/genomesubmit>. Acesso em: 20 fev. 2012

Negrão-Corrêa DA, Pereira CA, Rosa FM, Martins-Souza RL, Andrade ZA, Coelho PMZ. Molluscan response to parasite: *Biomphalaria* and *Schistosoma mansoni* interaction. *Invertebrate Surviv J*, 2007; 4: 101-11.

Olivier L, Barbosa FS, Coelho MV. The influence of infection with *Schistosoma mansoni* on survival of *Australorbis glabratus*. *Publ. avulsas cent. pesquis. Aggeu Magalhaes.*, 1954; 3: 63-71.

Olivier L, Barbosa FS. Seasonal studies on *Australorbis glabratus* Say from two localities in eastern Pernambuco, Brazil. *Publ. avulsas cent. pesquis. Aggeu Magalhaes.*, 1955a; 4: 79-103.

Pan C. Studies on the host- parasite relationship between *Schistosoma mansoni* and the snail *Australorbis glabratus*. *Am.J. Trop. Med. Hyg*, 1965 Nov.; 14 (6): 931-976.

Paraense WL. Autofecundação e Fecundação cruzada em *Australorbis glabratus*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1955; 53 (2,3 e 4): 277-84.

Paraense WL, Deslandes N. Studies on *Australorbis glabratus*. I: Bioespecific characterization. II: Genetic status. *Rev Bras Biol*, 1955;15:341-348.

Paraense WL, Corrêa LR. Variation in susceptibility of populations of *Australorbis glabratus* to a strain of *Schistosoma mansoni*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 1963 Jan-Feb.; 5: 15-22.

Paraense WL. Planorbídeos hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni*. In Cunha, AS, organizadores. *Esquistossomose Mansônica*. São Paulo: Savier/ Edusp; 1970. P. 13-30.

Paraense WL. Fauna planorbídica do Brasil. In: Lacaz CS, Baruzzi GR, Siqueira JRW, editores. *Introdução à geografia médica do Brasil*. São Paulo: Ed. Universidade de São Paulo; 1972. P. 213-39.

Paraense WL, Corrêa LR. Susceptibility of *Biomphalaria peregrina* from Brazil and Ecuador to two strains of *Schistosoma mansoni*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 1973 May-Jun.; 15 (3): 127-30.

Paraense, WL. A natural population of *Heliosoma duryi* in Brazil. *Malacol.*, 1976; 15 (2): 369-76.

Paraense WL, Corrêa LR. Differential susceptibility of *Biomphalaria tenagophila* populations to infection with a strain of *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.*, 1978 Oct.; 64 (5): 822-26.

Paraense WL. Distribuição dos caramujos no Brasil. In: Reis EA, Faria I, Katz N, organizadores. *Modernos conhecimentos sobre Esquistossomose Mansônica*. Belo Horizonte: Academia Mineira de Medicina; 1986. P. 51-66.

Paraense WL, Corrêa LR. Probable extension of *schistosomiasis mansoni* to southern most Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1987; 82 (4): 577.

Paraense WL. The schistosomose vectors in the Americas. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 96, supl, p. 7-16, 2001. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 2001; 96 (Suppl. 1): 7-16.

Pellegrino, J, Macedo D G. A simplified method for the concentration of cercarial. *J. Parasitol.*, 1955;41:306-309.

Pellegrino J, Katz N. Experimental chemotherapy of *Schistosomiasis mansoni*. *Adv. Parasitol.*, 1968.; 6: 233-90.

Pereira MH, Silva RE, Azevedo AM, Melo AL, Pereira LH. Predation of *Biomphalaria glabrata* during the development of *Belostoma anurum* (Hemiptera, *Belostomatidae*). *Rev. Inst. Med. Trop.*, São Paulo, 1993 Sep-Oct.; 35(5): 405-9.

Pereira CA, Martins-Souza RL, Coelho PMZ, Lima WS, Negrão-Corrêa DA. Effect of *Angiostrongylus vasorum* infection on *Biomphalaria tenagophila* susceptibility to *Schistosoma mansoni*. *Acta Trop.*, 2006 Jul.; 98 (3):224-33.

Pereira CAJ, Martins-Souza RL, Corrêa JR, Coelho PMZ, Negrão-Corrêa, DA. The participation of cell-free hemolymph of *Biomphalaria tenagophila* in the defense mechanism against to *Schistosoma mansoni* sporocysts. *Parasite Immunol.*, 2008; 30: 610-19.

Perlowagora SA. Studies on the biology of *Australorbis glabratus*, Schistosome- Bearing Brazilian snail. Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop, 1958 Oct.;10: 459-531.

Pieri OS, Raymundo JS, Juberg P. Estudos sobre o comportamento dos planorbídeos: II Enterramento de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) como meio de proteção contra a dessecação. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 1980; 75: 83-88.

Pieri OS. Perspectivas no controle ambiental dos moluscos vetores da esquistossomose. In: Barbosa FS, organizador. Tópicos em Malacologia Médica. Rio de Janeiro: Fiocruz; 1995. P. 239-252.

Pointier JP, Therón A, Imbert-Estabelet D, Borel G. Eradication of a Sylvatic focus of *Schistosoma mansoni* using biological control by competitor snails Biol. Control, 1991; 1: 244-247.

Pointier JP, Théron A, Borel G. Ecology of the introduced snail *Melanoides tuberculata* (Gastropoda: Thiaridae) in relation to *Biomphalaria glabrata* in the marshy forest zone of Guadeloupe, French West Indies. J. Molluscan Stud., 1993; 59: 421-428.

Pointier J P, Jourdane J. Biological control of the snail hosts of schistosomiasis in areas of low transmission: the example of the Caribbean area. Acta Trop., 2000;77: 53-60.

Prentice MA. Displacement of *Biomphalaria glabrata* by the snail *Thiara granifera* in field habitats in St. Lucia, French West Indies. Annals of Trop. Med. and Parasitol., 1983; 77: 57-59.

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

Richards CS. Genetics studies of a molluscan vector of schistosomiasis. Nature, 1970; 227: 806-10.

Richards CS, Merrit Jr., JW. Genetic factors in the susceptibility of juvenile *Biomphalaria glabrata* to *Schistosoma mansoni* infection. Am. J. Trop. Med. Hyg, 1972 Jul.; 21 (4): 425-34.

Rosa FM, Caldeira RL, Carvalho OS, Godard ALB, Coelho PMZ. Dominant character of a *Biomphalaria tenagophila* strain (Mollusca: Planorbidae) resistant to *Schistosoma mansoni*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2004 Feb.; 99 (1): 85-7.

Rosa FM, Godard ALB, Azevedo V, Coelho PMZ. *Biomphalaria tenagophila*: dominant character of the resistance to *Schistosoma mansoni* and descendants of cross-breeding between resistant (Taim, RS) and susceptible (Joinville, SC) strains. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 2005 jan-fev; 100 (1): 19-23.

Rosa FM, Godard ALB, Negrão-Corrêa D, Rodrigues HA, Carvalho OS, Caldeira RL, Teles HMS, Maciel E, Jannotti-Passos LK, , Coelho PMZ. *Biomphalaria tenagophila*: Dynamics of Populations of Resistant and Susceptible Strains to *Schistosoma mansoni*, with or without Pressure of the Parasite. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 2006; 101 (Suppl. 1): 247-51.

Rosa FM. *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835) da linhagem do Taim, RS: Estudos de campo e laboratorial visando o controle da transmissão da esquistossomose [Tese]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2008.

Sanguinetti JC, Dias Neto E, Simpson A J G. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. Bio Techniques, 1994; 5: 915-18.

Santos MBL, Freitas JR, Correia MCR, Coelho PMZ. 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, 1979; 21: 281-286.

São Paulo. Secretaria de Estado da Saúde. Centro de Vigilância Epidemiológica. Esquistossomose Mansônica. Informe Técnico; 2009

São Paulo. Secretaria de Estado da Saúde. Centro de Vigilância Epidemiológica. Coordenadoria de Controle de Doenças. II Semana Estadual da Esquistossomose/SES-SP. Informe NET-DTA; 2010.

Schall V, Massara CL, Enk MJ, Barros HS, Miranda ES. Os caminhos da esquistossomose dentro do nosso corpo. Belo Horizonte: FIOCRUZ/Instituto René Rachou, 2007. 44p. ISBN: 978-8599016-09-1. (Série Esquistossomose, n. 8, parte I).

SES-SP (Secretaria De Estado Da Saúde). Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar, Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac", Coordenadoria de Controle de Doenças. New strategies for schistosomiasis surveillance in the state of São Paulo, Southeastern Brazil. Rev. Saúde Pública [serial on the Internet]. 2009 Aug [cited 2011 Oct 17]; 43(4): 728-730. Available from: http://www.scielosp.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89102009000400022&lng=en
<http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89102009000400022>.

Silva RE, Melo AL, Pereira LH. Suscetibilidade de *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria glabrata* de uma mesma região a duas cepas de *Schistosoma mansoni*. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 1994; 36: 409-15.

Silva JS. O conceito de espaço na epidemiologia das doenças infecciosas. Cad. Saúde Públ. 1997 out-dez.; 13 (4): 585-93.

Silva CA. Avaliação e retificação da identificação específica de moluscos do gênero *Biomphalaria* PRESTON, 1910 do acervo da Coleção de Malacologia Médica (Fiocruz-CMM) [Dissertação]. Belo Horizonte: Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ; 2012.

Siqueira LMV, Coelho PMZ, Oliveira AA, Massara CL, Carneiro NFF, Lustosa Lima AC, Enk MJ. Evaluation of two coproscopic techniques for the diagnosis of schistosomiasis in a low-transmission area in the state of Minas Gerais, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2011; 106 (7): 844-850.

Souza CP, Cunha R, Andrade ZA. Development of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria tenagophila*, *Biomphalaria straminea* and *Biomphalaria glabrata*. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 1995 May-Jun.; 37 (3): 201-6.

Souza D, Ciaravolo RMC, Yohko Ka, H, Gargioni C, Gonçalves ACM, Paula MB. Esquistossomose mansônica no Estado de São Paulo: Aspectos Epidemiológicos [Acesso em: 30 Ago. 2007]. Informe Mensal sobre Agravos à Saúde Pública. Disponível em: www.cve.saude.sp.gov.br/.

Steinmann P, Keiser J, Bos R, Tanner M, Utzinger J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimatives of people at risk. *Lancet Infect Dis*, 2006 jul.; 6 (7): 411-25.

Superintendência de Campanhas de Saúde Pública. Planejamento de atividades operacionais em campanhas e controle de endemias na área de influência do Projeto Sobradinho, Brasília: SUCAM. 1974.

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

Superintendência de Controle de Endemias. 30 anos. Programa de controle da esquistossomose. Suplemento especial do Bol. Epidemiol. Paulista. Agosto de 2006. ISSN 1806-4272.

Sturrock RF. The influence of infection with *Schistosoma mansoni* on the growth rate and reproduction of *Biomphalaria pfeifferi*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 1966; 60 (2): 187-97.

Teles HMS. Estudo parasitológico, da transmissão e dos impactos da profilaxia da esquistossomose mansônica no Município de Bananal, Estado de São Paulo, Brasil [Dissertação]. São Paulo: Universidade Estadual de Campinas; 2001.

Teles, HMS, Carvalho ME, Ferreira CS, Zacharias F, Lima WR, Fadel MLC. Schistosomiasis *Mansoni* in Bananal (State of São Paulo, Brazil). I. Efficiency of Diagnostic and Treatment Procedures. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 2002, 97 (Supl. I): 181-186.

Teles HMS, Ferreira CS, Carvalho ME, Lima WR, Zacharias F. *Schistosomiasis mansoni* in Bananal (State of São Paulo, Brazil). II. Intermediate Hosts. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 2002, (97): 37-41.

Teles HM, Hiramoto RM, Oiveira JCN, Aveiro JA. Ocorrência de vetores da esquistossomose mansônica no litoral norte do Estado de São Paulo, Brasil. *Cad. Saúde Públ*, 2003, v. 19,: 1887-1891.

Teles HMS. Distribuição geográfica das espécies dos caramujos transmissores de *Schistosoma mansoni* no Estado de São Paulo. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 2005 set-out.; 38 (5): 426-32.

Teles HMS. Aspectos parasitológicos, imunológicos, epidemiológicos da esquistossomose mansônica no Município de Bananal, Estado de São Paulo, Brasil [Tese]. São Paulo: Universidade Estadual de Campinas; 2006.

Teles HMS, Carvalho OS. Implicações da Biologia de *Biomphalaria* no Controle da Esquistossomose. In: Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HL, organizadores. *Schistosoma mansoni* & Esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2008. 461-84.

Thiengo SC, Fernandez MA, Boaventura MF, Mattos AC, Gault CE, Santos SB, Freshwater Snails and Schistosomiasis Mansoni in the State of Rio de Janeiro, Brazil: I - Metropolitan Mesoregion. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 2001 Sept.; 96:177-184.

Thiengo SC, Fernandez MA, Boaventura MF, Santos SB, Mattos AC. Freshwater Snails and Schistosomiasis Mansoni in the State of Rio de Janeiro, Brazil: II - Centro Fluminense Mesoregion. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 2002 Jul.; 97 (5):621-626.

Thiengo SC, Fernandez MA, Boaventura MF, Magalhães MG, Santos SB. Freshwater Snails and Schistosomiasis Mansoni in the State of Rio de Janeiro, Brazil: III - Baixadas Mesoregion. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 2002 Oct.; 97 (Suppl 1):43-46.

Thiengo SC, Mattos AC, Boaventura MF, Loureiro MS, Santos SB, Fernandez MA. Freshwater snails and schistosomiasis mansoni in the state of Rio de Janeiro, Brazil: V – Norte Fluminense Mesoregion. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 2004 Aug.; 99 (Suppl. 1): 99-103.

Teodoro TM, Jannotti-Passos LK, Carvalho OS, Caldeira RL. Occurrence of *Biomphalaria cousini* (Mollusca: *Gastropoda*) in Brazil in its susceptibility to *Schistosoma mansoni* (Platyhelminths: Trematoda). *Mol. Phylogenet. Evol.*, 2010 Oct.; 57 (1): 144-51.

Traub RJ, Monis PT, Robertson LD. Molecular epidemiology: A multidisciplinary approach to understanding parasitic zoonoses. *Int. J. Parasitol.* 2005 Oct.; 35 (11-12): 1295-307.

Trigwell JA, Dussart GBJ. Functional protandry in *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda: Pulmonata), an intermediate host of *Schistosoma*. *J. Moll. Stud.*, 1998; 64 (2): 253-56.

Vernon JG, Taylor JK. Patterns of sexual roles adopted by the schistosome-vector snail *Biomphalaria glabrata* (*Planorbidae*). *J. Mollusc. Stud.*, 1996; 62 (2): 235-241.

Vidigal THDA, Spatz L, Nunes DN, Simpson AJG, Carvalho OS, Dias-Neto E. *Biomphalaria spp.*, identification of the intermediate snail hosts of *Schistosoma mansoni* by polymerase chain reaction simplification and restriction enzyme digestion of the ribosomal RNA gene Intergenic spacer. *Exp Parasitol*, 1998 Jun.; 89 (2): 180-87.

Vidigal THDA, Caldeira RL, Simpson AJG, Carvalho OS. Further studies on the molecular systematics of *Biomphalaria* snails from Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 2000a Jan-Feb.; 95 (1): 57-66.

VNews. Bananal atrai turistas que buscam sossego e a história dos tempos áureos do café. *Jornal eletrônico de São José dos Campos*. Disponível em: <http://www.vnews.com.br/noticia.php?id=69097>. Acesso em: 23 jul. 2011.

Weinzettl M, Jumberg P. Biological control of *Biomphalaria tenagophila* (Mollusca, *Planorbidae*), a Schistosomiasis vector, using the fish *Geophagus brasiliensis* (Pisces, *Cichlidae*) in the laboratory or in a natural environment. *Mem. Ins. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 1990 jan-mar.; 85 (1); 35-38.

World Health Organization. Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis: report of a WHO expert committee. *WHO Tech Rep Ser* 2002; 912: 1-57.

World Health Organization. The world health report 2004: changing history. Geneva: WHO, 2004.

World Health Organization. Schistosomiasis. WHO Media centre, Fact Sheet N° 115, January, 2012.

Zanna RD. Diversidade Genética de *Biomphalaria tenagophila* (Orbgny, 1835) (Gastrópoda: Planorbidae) no Estado de São Paulo, Brasil [Dissertação]. São Paulo: Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde; 2010.