

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM COMPORTAMENTO E BIOLOGIA ANIMAL**

Fernanda Luiza de Almeida

**MONITORAMENTO DA POPULAÇÃO DE *Biomphalaria tenagophila*
(GASTROPODA, PLANORBIDAE) EM BANANAL-SP NO PERÍODO DE
2013 – 2015, APÓS A INTRODUÇÃO DA LINHAGEM DO TAIM-RS**

**Juiz de Fora
2018**

Fernanda Luiza de Almeida

**MONITORAMENTO DA POPULAÇÃO DE *Biomphalaria tenagophila*
(GASTROPODA, PLANORBIDAE) EM BANANAL-SP NO PERÍODO DE
2013 – 2015, APÓS A INTRODUÇÃO DA LINHAGEM DO TAIM-RS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, área de concentração: Comportamento e Biologia Animal, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Prof^{ta}. Dr^a. Florence Mara Rosa

Juiz de Fora
2018

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Almeida, Fernanda Luiza de.

Monitoramento da população de *Biomphalaria tenagophila* (Gastropoda, Planorbidae) em Bananal-SP no período de 2013-2015, após a introdução da linhagem do Taim-RS / Fernanda Luiza de Almeida. -- 2018.

74 p. : il.

Orientadora: Florence Mara Rosa

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Comportamento Animal, 2018.

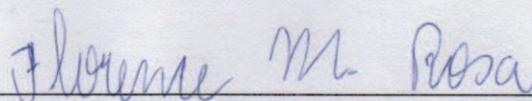
1. Esquistossomose. 2. Controle Biológico. 3. *Biomphalaria tenagophila*. 4. *Schistosoma mansoni*. 5. Brasil. I. Rosa, Florence Mara, orient. II. Título.

MONITORAMENTO DA POPULAÇÃO DE *Biomphalaria tenagophila*
(GASTROPODA, PLANORBIDAE) EM BANANAL-SP NO PERÍODO DE
2013 – 2015, APÓS A INTRODUÇÃO DA LINHAGEM DO TAIM-RS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, área de concentração: Comportamento e Biologia Animal, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

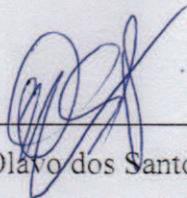
Aprovada em 27 de fevereiro de 2018.

BANCA EXAMINADORA



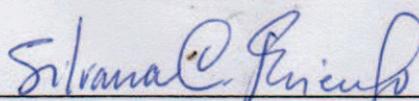
Prof^a Dr^a Florence Mara Rosa (Orientadora)

Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof. Dr. Olavo dos Santos Pereira Júnior

Universidade Federal de Juiz de Fora



Dr^a Silvana Aparecida Rogel Carvalho Thiengo

Instituto Oswaldo Cruz

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, por me fazer forte o suficiente para conseguir chegar até aqui. A batalha está só no início, mas Ele sempre estará ao meu lado mostrando o caminho e me ajudando a vencer passo a passo cada obstáculo que aparecer pela frente.

À Florence, minha orientadora, por toda ajuda com a parte prática do trabalho, com a escrita, com as mudanças de planos pelo caminho, com as conversas que muitas vezes fugiram aos assuntos da academia e pela disponibilidade para tornar esse trabalho o melhor possível.

Ao Professor Paulo Marcos Zech Coelho por sempre me ensinar tanto durante as poucas conversas que tivemos, por me receber no CPqRR, por conceder toda infraestrutura para que eu pudesse infectar meus moluscos e trazê-los de volta à UFJF.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos, ao CNPq por custear o projeto, a UFJF pelo auxílio financeiro nas viagens a Belo Horizonte e por toda a infraestrutura. Ao programa de pós-graduação em Comportamento e Biologia Animal pela infraestrutura e oportunidade. Aos Professores Dr. Artur Andriolo e Dr. Fábio Prezoto, coordenadores do PPG, pela disponibilidade e atenção.

Aos professores das disciplinas que contribuíram tanto para a minha formação. Professoras Juliane Floriano Lopes, Iara Novelli, Jane Azevedo, Karla Garcia. Professores Fábio Prezoto, Erik Daemon, Ralph Maturano, Caio Monteiro, Fabiano Vieira, Ronaldo Bastos, Augusto Souza, Gilberto Gazeta, Marco Antônio Manhães. Agradeço de forma especial à professora Juliane que me ajudou além da disciplina com a parte estatística e ao Professor Erik por ter me motivado tanto, ainda na graduação, além de tantas vezes me socorrer na época da iniciação científica e pelas vezes que conversamos sobre a vida. Você faz muita falta!!!

À professora Sthefane D'Ávila pelas contribuições na execução do projeto, por compartilhar sua enorme experiência com os moluscos e com tudo que permeia esse tema e por ser uma grande mão amiga em momentos muito importantes. Aos professores Marcelo Santos e Olavo Santos pela ajuda e por compartilhar toda experiência necessária para a execução da parte molecular.

Aos Professores Dr. Roberto Júnio, Dra. Sthefane D'Ávila, Dr. Olavo Santos, Dra. Priscila Faria, Dra. Silvana Thiengo e ao Dr. Aristeu Silva Neto por aceitarem o convite de participação das bancas e pelas contribuições tão importantes que aumentaram o

sucesso da confecção de todo esse trabalho, durante as avaliações de projeto, qualificação e defesa da dissertação.

Às professoras do NUPEP por compartilharem momentos, experiências e o laboratório. Professoras Clarisse Abramo, Elaine Coimbra e Kézia Scopel. Agradeço de forma especial a Kézia por muitas vezes me coorientar, compartilhar sua vasta experiência prática e teórica além de tantas conversas sobre a vida.

Ao Professor Gilson Castro, meu amigo e orientador do Trabalho de Conclusão de Curso por me motivar a continuar na carreira acadêmica, por compartilhar tanta experiência e por estar sempre disponível. Você me ensinou a criar forças no Bacharelado e seguir em frente!

Às queridas companheiras de laboratório Alyssa, Ayla, Bárbara, Daniela, Juliane, Juliana, Stephane, Patrícia, Roberta. Obrigada por tanto e por tudo que vivemos juntas, seja com assuntos relacionados a academia, seja com assuntos do dia a dia. Agradeço também as alunas de graduação que passaram pelo laboratório e fizeram parte deste momento. Laura Costa (obrigada pela paciência e por compartilhar todo seu aprendizado), Yasmin Gomes (obrigada pela ajuda no cuidado dos nossos moluscos), Carol Evangelista, Livia, Júlia, Laís, Carol Brandi, Marina Rocha, Marina Santos e Mylena.

Ao João Batista e ao Ernani Cabral, meus queridos colegas de coleta. Obrigada por todo esforço durante as nossas viagens à fazenda Herivelto Martins. Obrigada por toda ajuda nos escorregões morro acima e morro abaixo, nos atolamentos dentro do córrego e na coleta dos moluscos. Sem vocês, não teria nem como começar o trabalho!

Aos colaboradores e proprietários da chácara Santa Inês, Dr. Engels Maciel e Dra. Maria Lúcia (Minuca) por sempre receberem a equipe com muita atenção. Ao Áureo Almeida Oliveira por nos acompanhar nas atividades no CPqRR, à Jussara pela recepção sempre tão calorosa e à Dra. Lângia Colli por fornecer os miracídios e as *Biomphalaria glabrata* para os testes de infecção.

Aos secretários do PPG do Comportamento Animal Marlú, Dayane e Osmar, por todo esclarecimento e ajuda nas questões burocráticas. Às técnicas do NUPEP, Cristina, pela convivência no dia a dia, e Ivone, por me ajudar tanto durante o período de estágio à docência. A Bárbara, técnica do Laboratório Integrado de Pesquisas, pelas contribuições com parte da biologia molecular. À Lenir e ao Sr. Jorge por serem nossos braços fortes de laboratório nos ajudando todos os dias.

Saindo um pouco do cenário acadêmico...

Agradeço ao meu marido, Lucas, por tudo que fez por mim, pelo amor e cuidados. Obrigada pela atenção, pelo apoio, pela companhia e por acreditar em mim até mais que eu mesma. Muitas vezes distante se fez sempre presente pelas conversas longas ao telefone em momentos de desespero.

Aos meus pais, Luiz e Joana, que me deram a vida, investiram na minha educação e me ajudaram da melhor forma que poderiam. À minha irmã, Fabiana, que sempre torceu por mim, sempre me motivou a crescer e esteve sempre disponível quando precisei.

Aos meus amigos, sempre presentes. Ariadne, Edinho, Fernando, Lélia, Lívia, Telma e Thiago. À Amanda, minha afilhada que amo e a quem mais devo a presença por conta desse trabalho. À Bia pelo carinho de sempre! À minha sogra Eliane. Aos meus cunhados Luiz, Luciano e Tairine. Um agradecimento especial ao Luiz pela ajuda no Excel com os dados pluviométricos! À toda a minha família, com um agradecimento especial aos meus tios Monica e Júnior pelos conselhos e por me ouvirem quando mais precisei. À Sra. Olny, à Olny Maria e ao Fernando Lamim... a gratidão é eterna por tanto!

À Valentina... minha grande amiga e ouvinte de quatro patas que sempre se fez presente com um olhar de amor infinito e uma atenção sobrenatural.

Aos brasileiros que com o pagamento dos impostos mantêm esse país como um todo, inclusive as agências fomentadoras de pesquisas, que permitem que o trabalho científico continue! Vocês só precisavam saber da força que tem. Só vocês (nós) podemos dar um jeito nesse país!

"Ninguém é suficientemente perfeito que não possa aprender com o outro e ninguém é totalmente destituído de valores que não possa ensinar algo ao seu irmão."

São Francisco de Assis

RESUMO

No presente estudo, a eficácia do novo modelo de controle biológico na transmissão da esquistossomose foi avaliada em uma coleção hídrica do município de Bananal-SP. Esse modelo, consiste na introdução em larga escala de espécimes da linhagem *B. tenagophila* do Taim (resistente) com a finalidade de transmitir a sua resistência, de caráter dominante, a populações de *B. tenagophila* (suscetíveis) do córrego Herivelto Martins. Para avaliar o efeito dessa introdução sobre os níveis de suscetibilidade da população de Bananal, foi conduzido um estudo durante o período de 2013 a 2015. Os parâmetros analisados foram as taxas de suscetibilidade e a presença do marcador molecular típico da linhagem do Taim (350 pb). Os resultados obtidos mostraram que os descendentes dos moluscos coletados 40 e 64 meses após a introdução, que foram submetidos aos testes de infecção com a cepa SJ de *S. mansoni*, apresentaram taxas de suscetibilidade de 17,3% e 40,54%, respectivamente. Esses dados indicam diferenças significativas na suscetibilidade dos moluscos quando comparados com as taxas do grupo controle, 34,6% e 68,08%, respectivamente. Foi observado um aumento na suscetibilidade no grupo de moluscos analisados após 64 meses, bem como no seu grupo controle. Nesse estudo não foi possível avaliar as taxas de infecção dos descendentes dos moluscos coletados aos 52 meses. Apenas os testes moleculares foram realizados, sendo todos exemplares negativos para a presença do marcador de 350 pb. Por outro lado, esse marcador estava presente respectivamente em 26,92% e 11,76% das amostras analisadas após 40 e 64 meses da intervenção. A redução no volume do córrego Herivelto Martins, entre os anos de 2014 e 2015, causada por baixa precipitação anual, reduziu a densidade populacional dos moluscos. Entretanto, a presença do patrimônio genético da linhagem do Taim, indica o sucesso da introdução, mostrando a eficácia desse formato de controle da esquistossomose.

Palavras-chave: Esquistossomose, Controle biológico, *Biomphalaria tenagophila*; *Schistosoma mansoni*, Brasil.

ABSTRACT

In the present study, the efficacy of the new model of biological control in the transmission of schistosomiasis was evaluated in a stream in the city of Bananal-SP. This model consists of the large-scale introduction of specimens of the Taim strain *B. tenagophila* (resistant) with the purpose of transmitting their dominant resistance to *B. tenagophila* (susceptible) populations of the Herivelto Martins stream. To evaluate the effect of this introduction on the levels of susceptibility of the Bananal population, a study was conducted during the period from 2013 to 2015. The parameters analyzed were the susceptibility rates and the presence of the typical molecular marker of the Taim lineage (350 bp). The results showed that the offspring of the molluscs collected 40 and 64 months after the introduction, that were submitted to the tests of infection with *S. mansoni* SJ strain, presented susceptibility rates of 17.3% and 40.54% respectively. These data indicate significant differences in molluscs susceptibility when compared to the control group rates, 34.6% and 68.08%, respectively. An increase in susceptibility in the group of molluscs analyzed after 64 months, as well as in their control group was observed. In this study it was not possible to evaluate the infection rates of the mollusc descendants collected at 52 months. Only the molecular tests were performed, being all specimens negative for the presence of the 350 bp marker. On the other hand, this marker was present in 26.92% and 11.76% of the analyzed samples, after 40 and 64 months of intervention, respectively. The reduction in the volume of the Herivelto Martins stream, between the years 2014 and 2015, caused by low annual precipitation, reduced the population density of molluscs. However, the presence of genetic patrimony of the Taim lineage indicates the success of the introduction, showing the efficacy of this form of schistosomiasis control.

Key words: Schistosomiasis, Biological control, *Biomphalaria tenagophila*; *Schistosoma mansoni*, Brazil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição da esquistossomose no mundo em 2014. Fonte: WHO (Adaptado)	16
Figura 2: Distribuição de casos de esquistossomose no Brasil em 2015. Fonte: Ministério da Saúde.....	17
Figura 3: Ciclo evolutivo do <i>Schistosoma mansoni</i> . Fonte: CDC (Adaptado).	20
Figura 4: Distribuição espacial da espécie <i>Biomphalaria glabrata</i> no território brasileiro. Fonte: Carvalho et al. (2008).....	22
Figura 5: Distribuição espacial da espécie <i>Biomphalaria tenagophila</i> no território brasileiro. Fonte: Carvalho et al. (2008).....	23
Figura 6: Distribuição espacial da espécie <i>Biomphalaria straminea</i> no território brasileiro. Fonte: Carvalho et al. (2008).....	24
Figura 7: Concha de <i>Biomphalaria tenagophila</i> . Fonte: Paraense, 2008.	28
Figura 8: Sistema genital de <i>Biomphalaria tenagophila</i> . Fonte: Paraense, 2008 (Adaptado).	29
Figura 9: Córrego Herivelto Martins, Bananal SP, indicando o local da introdução da linhagem resistente do Taim, as nascentes do entorno e a foz desembocando no córrego Scamping. Escala 1:2000. Fonte: LO Carraro Engenharia e Construtora.	40
Figura 10: Coleta dos moluscos no córrego Herivelto Martins, Bananal SP. Fonte: Acervo pessoal.....	42

Figura 11: Caixa de plástico com aerador, termostato e isopor para desovas contendo moluscos coletados no campo. Fonte: Acervo pessoal..... 44

Figura 12: Cálice escuro contendo fígados de hamsters macerados em solução salina e balão de fundo chato com borda transparente em luz artificial para migração dos miracídeos. Fonte: Acervo pessoal..... 45

Figura 13: Gráfico com análise comparativa entre os testes de infecção realizados após 14 meses de introdução, por Marques et al. (2014), e os testes de 40 e 64 meses após a introdução da linhagem resistente de *Biomphalaria tenagophila* (d'Orbigny, 1835) do Taim no Córrego Herivelto Martins, Bananal-SP. 53

Figura 14: Gel de Poliacrilamida 6% corado por nitrato de prata a 10%, após as técnicas PCR-RFLP, mostrando as amostras com os seguintes fragmentos: Na canaleta “P” o Padrão de Peso Molecular Phix 174 Hae III. Nas canaletas “Ct” o controle *Biomphalaria tenagophila* da linhagem do Taim evidenciando, com a seta, o fragmento de 350 pb. Na canaleta “Cc” o pool de cercárias de *Schistosoma mansoni* como controle dos fragmentos típicos do parasito (aproximadamente 600, 310 e 100 pb). Canaletas 1 e 2, espécimes de *B. tenagophila* positivas para a infecção com *S. mansoni*. Nas canaletas 3 a 6, fragmentos de *B. tenagophila* negativas. Nas canaletas 7 e 8, fragmentos de *B. tenagophila* negativas, evidenciando com as setas o marcador de 350 pb. 54

Figura 15: Gel de Poliacrilamida 6% corado por nitrato de prata a 10%, após as técnicas PCR-RFLP, mostrando os fragmentos de *Biomphalaria tenagophila* de 800 e 470 pb (canaletas 1 a 8). Na canaleta “P” o Padrão de Peso Molecular Phix 174 Hae III e na canaleta “Ct” o controle com a linhagem do Taim e os fragmentos de 470 e 350 pb.... 55

Figura 16: Gel de Poliacrilamida 6% corado por nitrato de prata a 10%, após as técnicas PCR-RFLP, mostrando os seguintes fragmentos: Na canaleta “P” o Padrão de Peso Molecular Phix 174 Hae III (P). Na canaleta “Cc” o pool de cercárias de *Schistosoma mansoni* como controle dos fragmentos típicos do parasito (aproximadamente 600, 310 e 100 pb). Nas canaletas “Ct”, o controle *Biomphalaria tenagophila* da linhagem do Taim evidenciando com as setas os fragmentos de 350 pb. Nas canaletas de 1 a 4, espécimes de *B. tenagophila* positivas para o teste de infecção com *S. mansoni*. Nas canaletas 05 e 06

fragmentos de *B. tenagophila* negativas para o teste de infecção, evidenciando, com setas, os fragmentos de 350 pb. Nas últimas quatro canaletas (amostras 7 a 10), fragmentos de *B. tenagophila* negativas. 56

Figura 17: Precipitação no Município de Bananal-SP entre os anos de 2010 e 2015.

Fonte: DAA/SP..... 57

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Grupos experimentais de *Biomphalaria tenagophila* utilizados nos testes de infecção..... 46
- Tabela 2:** Número de espécimes de *Biomphalaria tenagophila* coletados no córrego Herivelto Martins, Bananal-SP, durante o período de 2013 a 2015..... 51
- Tabela 3:** Número de descendentes positivos para o teste de infecção de espécimes de *Biomphalaria tenagophila* coletados no córrego Herivelto Martins, Bananal-SP, após 40 meses da introdução da linhagem do Taim-RS. 52
- Tabela 4:** Número de descendentes positivos para o teste de infecção de espécimes de *B. tenagophila* coletados no córrego Herivelto Martins, Bananal-SP, após 64 meses da introdução da linhagem do Taim-RS..... 53

SUMÁRIO

1- REVISÃO DE LITERATURA	16
1.1- A Esquistossomose	16
1.2- O Ciclo Biológico	18
1.3- Hospedeiros Intermediários	20
1.4- Aspectos Biológicos do gênero <i>Biomphalaria</i>	25
1.5- Alterações climáticas e impacto na dinâmica populacional dos moluscos.....	26
1.6- Morfologia e Biologia Molecular de <i>Biomphalaria tenagophila</i>	28
1.7- A linhagem do Taim.....	30
1.8- Controle Biológico	33
2- OBJETIVOS	36
2.1- Objetivo Geral	36
2.2- Objetivos Específicos	36
3- INTRODUÇÃO	37
4- MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1- Área de Estudo	39
4.2- Coleta dos moluscos	40
4.3- Identificação e exame parasitológico dos moluscos coletados.....	43
4.4- Manutenção dos Moluscos em laboratório	43
4.5- Parasito.....	44
4.6- Grupos experimentais dos testes de infecção.....	44
4.7- Análise molecular	46
4.7.1- Extração de DNA de <i>Biomphalaria tenagophila</i>	47
4.7.2- Extração de DNA das cercárias de <i>Schistosoma mansoni</i>	47

4.7.3- PCR.....	48
4.7.4- Eletroforese.....	49
4.7.5- RFLP.....	49
4.8- Comitê de Ética e autorização de coleta.....	50
4.9- Análise Estatística	50
4.10- Dados Pluviométricos.....	50
5- RESULTADOS	51
5.1- Local e Coleta	51
5.2- Testes de Infecção.....	51
5.2.1- Amostras de 2013	51
5.2.2- Amostras de 2014	52
5.2.3- Amostras de 2015	52
5.3- Análise Molecular.....	54
5.3.1- Amostras de 2013	54
5.3.2- Amostras de 2014	55
5.3.3- Amostras de 2015	56
5.4- Dados pluviométricos.....	57
6- DISCUSSÃO	58
7- PERSPECTIVAS	60
8- CONCLUSÃO	61
9- REFERÊNCIAS	62

1- REVISÃO DE LITERATURA

1.1- A Esquistossomose

A esquistossomose é uma parasitose definida como doença negligenciada, afetando cerca de 260 milhões de pessoas, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais (WHO, 2016). É causada por trematódeos digenéticos do gênero *Schistosoma* Weiland, 1858, sendo que as seguintes espécies são responsáveis pela parasitose no mundo: *Schistosoma haematobium* (Bilharz, 1852), *S. intercalatum* Fischer, 1934, *S. japonicum* Katsurada, 1904, *S. mansoni* Sambon, 1907, *S. mekongi* Voge, Brickner & Bruce, 1978 (AMARAL et al., 2006; COLLEY et al., 2014).

A maior prevalência da parasitose está no Continente Africano, onde há 90% dos casos registrados, seguido da América Latina, sudeste asiático, Mediterrâneo oriental, Pacífico ocidental e alguns poucos casos registrados na Europa (BISOFFI et al., 2016; BOISSIER et al., 2015; COLLEY et al., 2014; GRYSEELS et al., 2006; WHO, 2016; WHO, 2017).

Em 2014, o número de pessoas tratadas com o Praziquantel, droga essa utilizada para o tratamento de pacientes portadores dos vermes adultos, foi de 258875452, sendo que 47,6% eram escolares entre 5 e 14 anos (WHO, 2016). A estimativa é que 91,4% desses pacientes residam no Continente Africano (Figura 1).

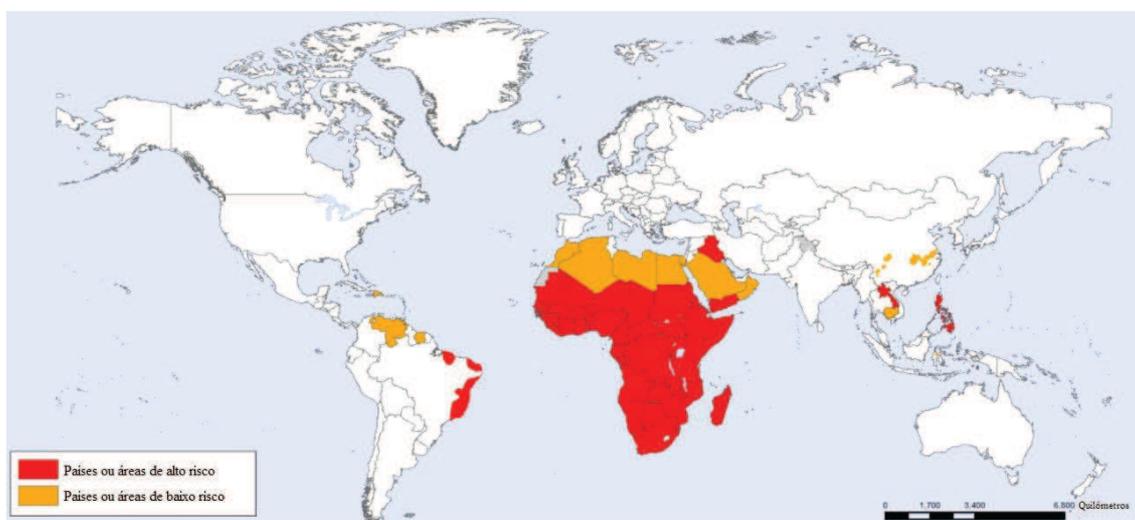


Figura 1: Distribuição da esquistossomose no mundo em 2014. Fonte: WHO (Adaptado)

Com ocorrência tropical, registrada em 54 países da África, Península Arábica e América Latina, a esquistossomose hepática intestinal é causada pelo *Shistosoma mansoni* Sambon, 1907 (COLLEY et al., 2014; GRYSEELS et al., 2006), sendo a única forma da parasitose encontrada no continente americano. Seu primeiro registro foi realizado por Pirajá da Silva em 1908 e desde então é considerada como endêmica e um grave problema de saúde pública (AMARAL et al., 2006; BRASIL, 2008^b; COELHO, 2008).

No Brasil, entre o período de 2000 a 2016, foram registrados 280406 casos de esquistossomose, em áreas endêmicas, sendo que 216802 se encontram na região Nordeste e 62691 no Sudeste (Figura 2) (BRASIL, 2016).

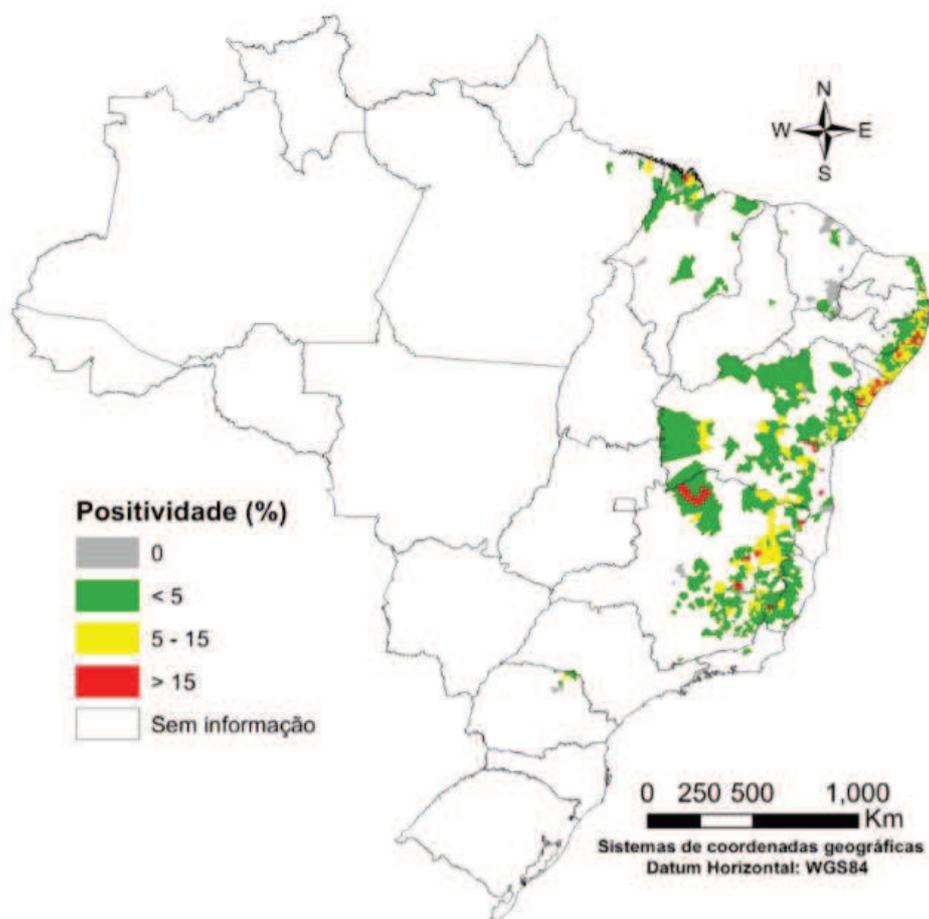


Figura 2: Distribuição de casos de esquistossomose no Brasil em 2015. Fonte: Ministério da Saúde

As medidas de controle se baseiam principalmente no tratamento quimioterápico, entretanto este não é capaz de interromper o ciclo do parasito, impedindo novas reinfecções. Para isso, é necessária a integração de pesquisas associadas também ao

controle de moluscos que atuam como hospedeiros intermediários, bem como a implementação de ações que melhorem a qualidade de vida populacional, como o acesso a água potável e saneamento básico, além de uma educação voltada para conscientização, higiene pessoal e coletiva (COELHO & CALDEIRA, 2016; WHO, 2016; WHO, 2017).

1.2- O Ciclo Biológico

O ciclo biológico de *S. mansoni* (Figura 3) envolve dois hospedeiros. Nos vertebrados, os vermes adultos realizam a reprodução sexuada. Nos hospedeiros intermediários do gênero *Biomphalaria* (Mollusca: Gatropoda: Pulmonata: Planorbidae), eles se reproduzem assexuadamente e realizam diferenciações entre suas formas evolutivas: miracídios-esporocistos-cercárias.

Quando um vertebrado, portador da parasitose, elimina seu material fecal em coleções hídricas, em condições favoráveis de temperatura (aproximadamente 28 °C), luminosidade e oxigenação hídrica, ocorre a eclosão de miracídios dos ovos provenientes desse material fecal. O miracídio é uma estrutura ciliar dotada de movimentos ativos, controlados pelo seu sistema nervoso primitivo, que promoverá sua viabilidade (por cerca de 8 horas) para o encontro do hospedeiro intermediário. O sucesso para a infecção é dependente de fatores ambientais, comportamento biológico de miracídios e moluscos, da compatibilidade fisiológica e bioquímica e dos mecanismos de defesa dos moluscos bem como os mecanismos de adaptabilidade dos miracídios/esporocistos a esses moluscos (COELHO et al., 2008^b).

No encontro do miracídio com *Biomphalaria* inicia uma nova fase do ciclo. Os miracídios com o uso do terebratorium, glândula com função adesiva e táctil, iniciam a fixação e a penetração nesses hospedeiros. Essa pode ocorrer em qualquer parte exposta do molusco, com preferência para a massa cefalopodal, entre a região do pé e dos tentáculos (COELHO, 1957). A partir desse momento começa a sua diferenciação em esporocistos, através de células germinativas em número de 50 a 100, presentes na sua estrutura corporal.

Após 72 horas de penetração ocorre a completa diferenciação em esporocisto primário. Após quatorze dias, em condições ideais de temperatura, ocorre o início de mais uma diferenciação. Cada esporocisto primário é dividido em 150 a 200 camadas celulares onde cada uma gerará o esporocisto secundário. Após 18 dias de infecção, essas formas começam sua migração para a glândula digestiva, definida como hepatopâncreas, e em

alguns casos de superinfecção, a migração ocorre também para o ovotestis (glândula reprodutiva) (COELHO et al., 2008^b).

Após cerca de 27 a 30 dias ocorre a completa diferenciação em cercárias. Estas apresentam cauda bifurcada e duas ventosas (oral e ventral) que serão utilizadas no processo de penetração no corpo do hospedeiro vertebrado. Cada miracídio produz, no final desse ciclo, 300 mil cercárias. A emergência dessa forma evolutiva segue um ritmo circadiano, dependente de luz e temperatura a aproximadamente 28 °C (COELHO et al., 2008^b).

Com a penetração no hospedeiro definitivo, *S. mansoni* admitirá novas formas evolutivas passando de cercária para esquistossômulo cutâneo, seguido de esquistossômulo pulmonar, verme imaturo e vermes adultos macho e fêmea (como característica da família Schistosomatidae, os vermes adultos apresentam dimorfismo sexual).

Após a adesão à pele, a penetração das cercárias tem duração de cerca de 5 a 15 minutos sendo que, após uma hora, essas se diferenciam em esquistossômulo cutâneos, atravessam a derme e iniciam a migração para os pulmões através do sistema venoso e/ou linfático. Os esquistossômulos acessam o lado direito do coração, principalmente pelo transporte através do fluxo sanguíneo venoso, de onde são conduzidos ao pulmão e às veias pulmonares. Entre dois a sete dias essas formas se diferenciarão em esquistossômulos pulmonares, aumentando seu comprimento e reduzindo seu diâmetro. Essa forma evolutiva o torna adaptado para a migração entre os capilares pulmonares em direção ao ventrículo esquerdo e posteriormente à chegada, através de diversas vias, ao sistema porta-hepático (LENZI et al., 2008).

Atingindo o sistema porta-hepático intestinal, os esquistossômulos se diferenciam em vermes imaturos, aumentando seu volume corporal, desenvolvendo uma ventosa oral, e posteriormente se desenvolvendo em vermes adultos. Entre o trigésimo e o trigésimo quarto dia após a infecção a fêmea inicia a postura, chegando a eliminar cerca de 300 mil ovos/dia. Metade desses ovos, a partir do trigésimo quinto dia, já podem ser observados em fezes do hospedeiro vertebrado. O restante dos ovos pode ser encontrado nos tecidos do hospedeiro, gerando reações teciduais como granulomas hepáticos e intestinais, hepatoesplenomegalia e fibrose periportal, eventos geradores dos sintomas típicos da parasitose (LENZI et al., 2008).

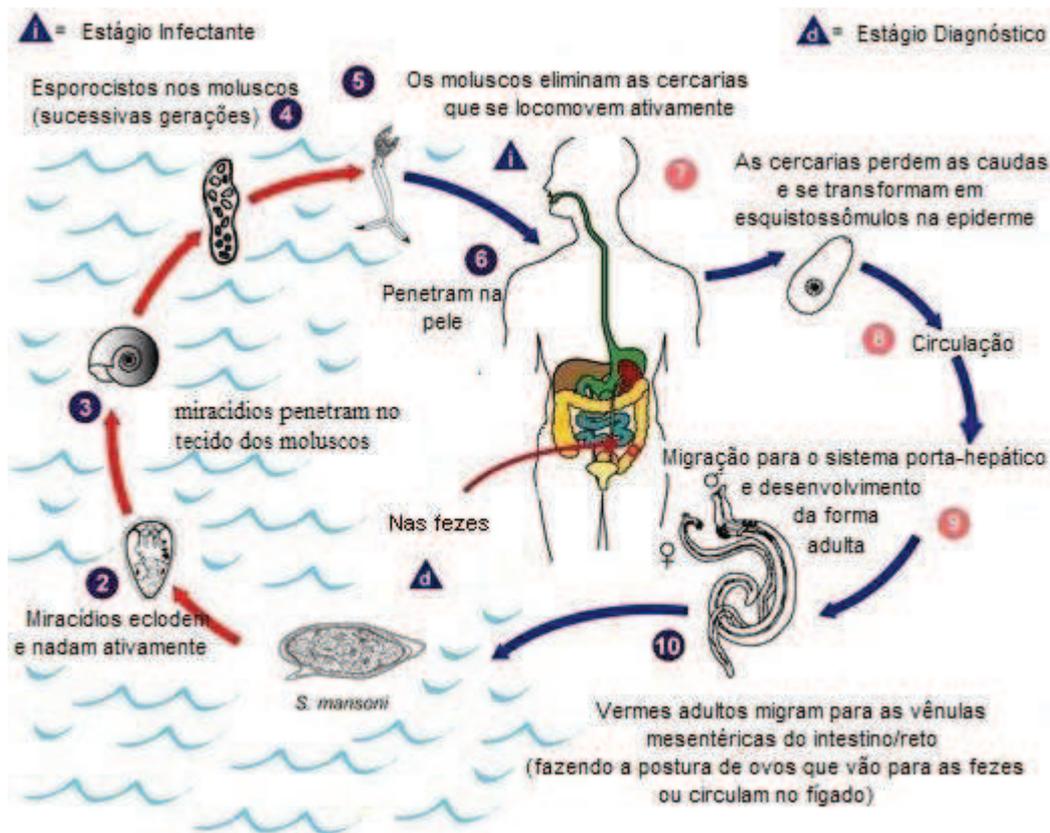


Figura 3: Ciclo evolutivo do *Schistosoma mansoni*. Fonte: CDC (Adaptado)

1.3- Hospedeiros Intermediários

No Brasil são encontradas onze espécies e uma subespécie do gênero *Biomphalaria*. *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* (Clessin, 1883), *B. tenagophila guaiabensis* Paraense, 1984 e *Biomphalaria cousini* Paraense, 1966 (CALDEIRA et al., 2010; PARAENSE, 1972; TEODORO, 2009).

As espécies *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea* são encontradas naturalmente infectadas pelo *S. mansoni* e, portanto, são as responsáveis pela transmissão da esquistossomose no Brasil (PARAENSE, 1972). Outras três espécies, *B. amazonica*, *B. peregrina* e *B. cousini* são consideradas hospedeiras em potencial do *S. mansoni*, de modo que em condições laboratoriais são capazes de eliminar cercárias quando

experimentalmente infectadas (PARAENSE & CORREA, 1973; TEODORO et al., 2010).

A ampliação dos conhecimentos sobre a distribuição geográfica das espécies brasileiras se faz importante a fim de orientar as medidas de controle da esquistossomose. O mapeamento dessa distribuição e a compreensão das mudanças ocorridas ao longo do tempo têm sido auxiliados pelo geoprocessamento. (CARVALHO et al., 2008; CARVALHO et al., 2010; GUIMARAES et al., 2010).

A principal espécie transmissora, *B. glabrata*, tem como localidade-tipo Guadalupe, na América Central, e também já foi registrada na Guiana Francesa, Suriname e na Venezuela. No Brasil seus registros estão notificados nos Estados de Alagoas, Bahia, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Minas Gerais, Pará, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, São Paulo e Sergipe (Figura 4) (CARVALHO et al., 2008; PARAENSE, 2001).

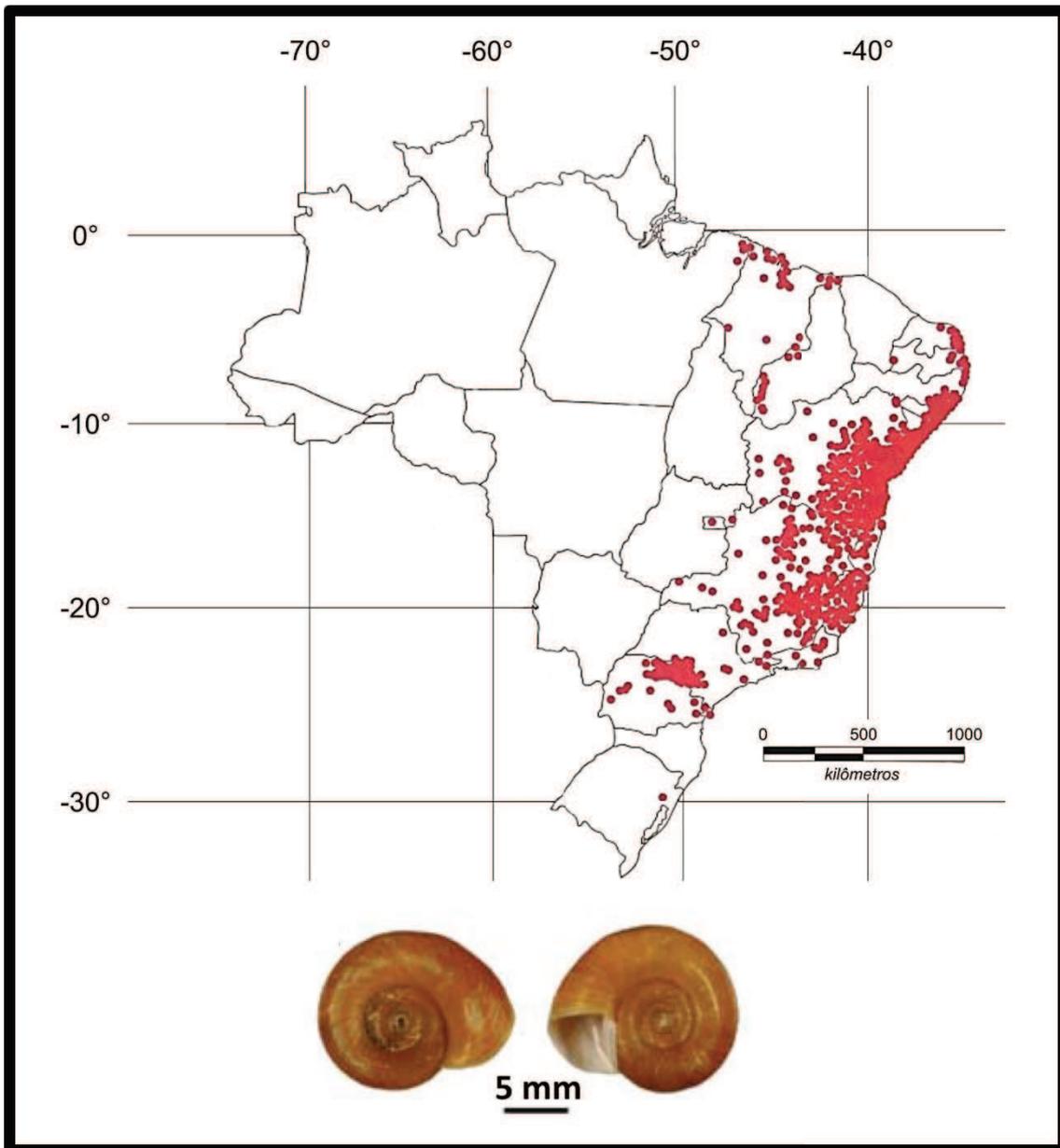


Figura 4: Distribuição espacial da espécie *Biomphalaria glabrata* no território brasileiro.
 Fonte: Carvalho et al. (2008)

A segunda espécie em importância epidemiológica é *Biomphalaria tenagophila* que tem como localidade tipo a Província de Corrientes, na Argentina. No Brasil é encontrada em 11 Estados brasileiros sendo Bahia, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, Santa Catarina e São Paulo. Em Minas Gerais, exemplares de *B. tenagophila* naturalmente infectados foram identificados nos municípios de Jaboticatubas, Itajubá, Belo Horizonte e Ouro Branco (Figura 5) (CARVALHO et al., 1985; MELO & PEREIRA 1985; SILVA et al., 1994). Em São Paulo e no Rio de Janeiro, foram registrados casos de

esquistossomose onde levantamentos malacológicos recentes registraram somente a presença *B. tenagophila*. (TELES; 2005; THIENGO et al., 2002).

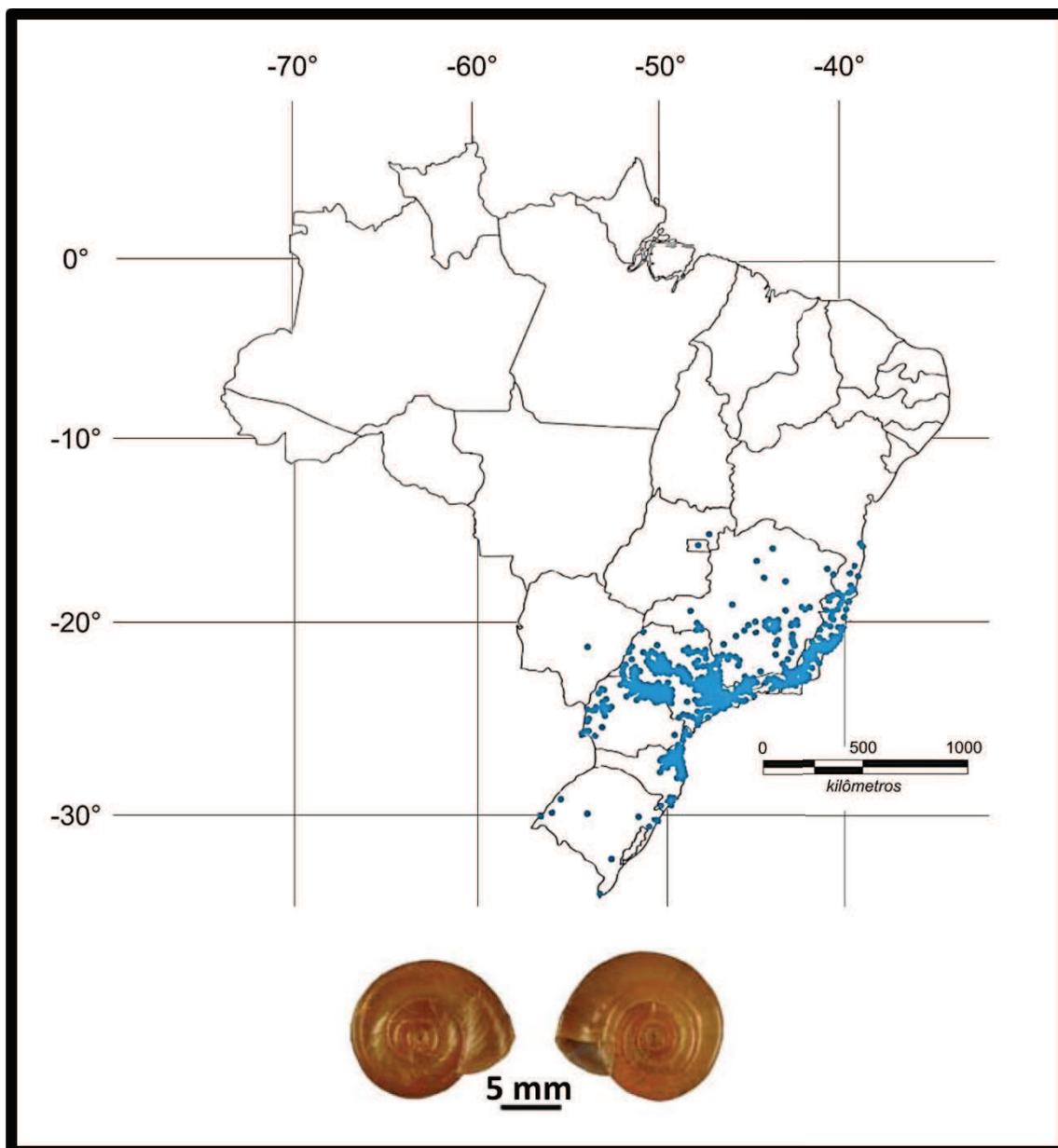


Figura 5: Distribuição espacial da espécie *Biomphalaria tenagophila* no território brasileiro. Fonte: Carvalho et al. (2008)

A espécie com maior distribuição geográfica é *B. straminea*, sendo registrada mais intensamente no Nordeste. Sua ocorrência é observada nos estados do Acre, Alagoas, Amazonas, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo, Sergipe, Tocantins e Roraima (Figura 6) (CARVALHO et al., 2008; PARAENSE, 1986).

Estudos malacológicos realizados nos estados do Rio de Janeiro e de São Paulo (PALASIO et al., 2015; THIENGO et al., 2001; THIENGO et al., 2002; THIENGO et al., 2004), atentam para a dispersão dessa espécie. Além disso, *B. straminea* está em constante expansão por se tratar de uma espécie melhor adaptada as variações climáticas, que vem se mostrando cada vez mais intensas (PALASIO et al., 2015).

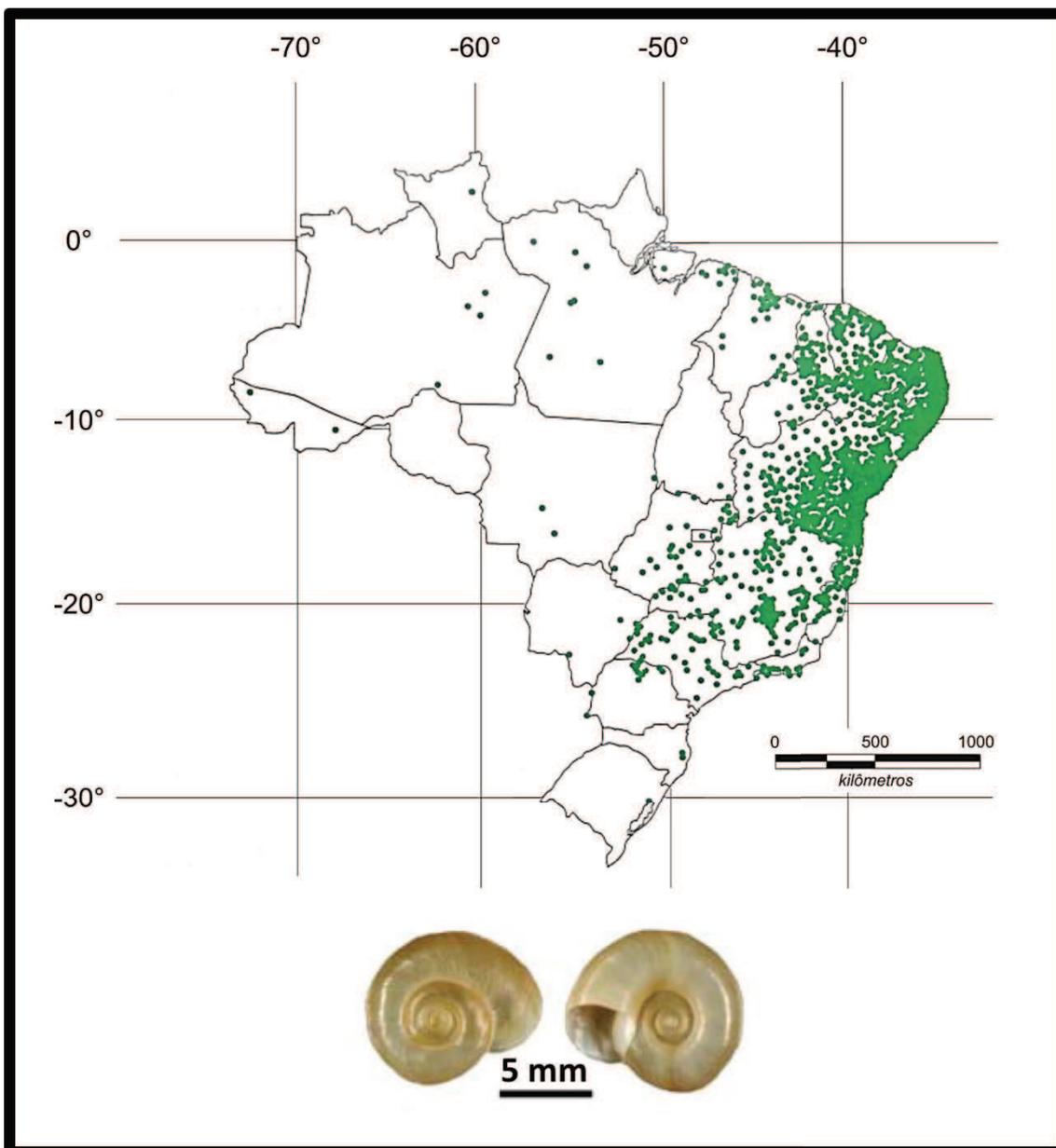


Figura 6: Distribuição espacial da espécie *Biomphalaria straminea* no território brasileiro. Fonte: Carvalho et al. (2008)

A ampliação dos conhecimentos sobre a distribuição geográfica das espécies brasileiras se faz importante a fim de orientar as medidas de controle da esquistossomose. Impactos ambientais são cada vez mais intensos e sugerem uma alteração nessas

distribuições a longo prazo, ampliando os sítios de infecção. Faz-se necessário, portanto, a detecção de espécies infectadas e/ou potencialmente transmissoras do *S. mansoni* a fim de monitorar possíveis alterações nessas distribuições.

1.4- Aspectos Biológicos do gênero *Biomphalaria*

As espécies do gênero *Biomphalaria* ocupam diversos tipos de coleções hídricas, sendo naturais ou artificiais, sempre paradas ou pouco correntes. Lagoas, lagos, cisternas, pântanos, remansos de rios, riachos, canais de irrigação, açudes, plantações e demais áreas alagadas, associadas a um substrato lodoso ou rochoso com vegetação enraizada ou flutuante, compõem o habitat desses moluscos (BRASIL, 2008; PARAENSE, 1970; PIERI, 1995)

A presença da vegetação, onde ocorre a postura de ovos, assegura um ambiente protegido de radiação solar e de fortes correntezas, além de manter a temperatura geralmente entre 20 e 25 °C. Outras características comuns ao habitat são a luminosidade, a presença de matéria orgânica, uma relativa turbidez, pH entre 6 e 8 e teor de sal abaixo de 0,3%.

O hábito alimentar se torna depende do substrato, onde o molusco, com auxílio da rádula, raspa o substrato e ingere partículas aderidas, sendo estas compostas de microrganismos, como algas e bactérias, o lodo, as folhas além de vegetais em decomposição e dejetos de outros animais (FREITAS, 1973; PARAENSE, 1972; PIERI, 1995).

Os moluscos do gênero *Biomphalaria* são hermafroditas, com preferência para fecundação cruzada. Paraense (1955) discute essa preferência de fecundação, inferindo que a autofecundação se torna o meio de reprodução apenas em condições adversas ou na tentativa de recolonização, quando apenas um indivíduo sobrevive. A ovipostura geralmente é noturna e os ovos apresentam-se envolvidos em cápsulas gelatinosas, resistentes e transparentes. Da cápsula ovígera são liberados os ovos de onde eclodem os moluscos que, em média, tem seu desenvolvimento completo com oito dias, em condições ideais de temperatura. (PARAENSE, 1955; PARAENSE, 1972; PARAENSE, 1976).

Algumas adaptações asseguram a sobrevivência desses moluscos. A diapausa consiste em uma parada no desenvolvimento mediante condições fisiológicas próprias do molusco. A estivação, por outro lado está intimamente relacionada a fatores externos, de modo que quando o ambiente sofre grandes mudanças, como aumento ou redução brusca

de temperatura, redução do fluxo de água ou ausência de alimento, o molusco é capaz de permanecer dentro da concha, secretando um muco responsável pelo fechamento da mesma (epifragma) interrompendo seu desenvolvimento. Na espécie *B. glabrata*, juvenis também podem apresentar lamelas no interior da abertura da concha, quando sujeitos a dissecação estacional. Na presença de ambientes aquáticos temporários, como a formação de poças que vão se reduzindo de forma gradual, esses moluscos realizam o comportamento de se enterrarem no solo (BARBOSA & OLIVIER, 1958; PARAENSE, 1957; PARAENSE, 1972; SARQUIS, PIERI & SANTOS, 1997; TELES & MARQUES, 1989).

O tempo de sobrevivência está intimamente relacionado à capacidade do molusco em conservar recursos como água, oxigênio e energia ao neutralizar os resíduos metabólicos. O seu tempo de vida no ambiente, em condições normais, pode chegar a um ano (PARAENSE, 1955).

1.5- Alterações climáticas e impacto na dinâmica populacional dos moluscos

Fatores climáticos interferem diretamente na sobrevivência e na disseminação de helmintos, como o *S. mansoni*, por meio de coleções hídricas no ambiente. Entre esses fatores, a temperatura e a precipitação estão intimamente relacionadas ao seu mecanismo de evolução no hospedeiro intermediário, alterando seu tempo de diferenciação miracídio-cercaria além de causar pressão seletiva no molusco. Somam-se a esse último fator a velocidade da coleção hídrica e a altitude, que interferem na dinâmica populacional desses moluscos, modificando principalmente o seu campo de colonização (CHIEFFI, 2015; FRENWICK et al., 2006; LAFFERTY, 2009; OPAS, 2009; PALASIO et al., 2015; ROSENTAL, 2009).

Nesse cenário, as mudanças climáticas, que podem ocorrer por ação antrópica ou por fenômenos naturais, têm afetado essa dinâmica como um todo (OPAS, 2009; PALASIO et al., 2015). Estudos atuais indicam alterações anormais na temperatura e nas precipitações por todo o mundo, evidenciando que a aceleração desse desequilíbrio ocorre principalmente pela ação antrópica (IPCC, 2012).

Na China, onde a esquistossomose é causada por *S. japonicum* e é transmitida pelo molusco Caenogastropoda *Oncomelaria hupensis* Gredler, 1881, ocorreu uma redução significativa dos doentes após o tratamento por Praziquantel. No entanto, a parasitose reapareceu em algumas regiões devido ao aumento de chuvas. Com as cheias das coleções

hídricas houve uma dispersão dos moluscos para outras regiões. Essa migração tornou-se ainda mais acentuada com a transferência de recursos hídricos do Sul para o Norte do país (XIAO-NONG et al., 2005; ZHENG et al., 2002).

Em um estudo analisando alterações na temperatura e seu efeito sobre flutuações na dinâmica populacional de *B. glabrata*, Camargo et al. (2017) registraram a ocorrência de modificações no período de diferenciação morfológica de *S. mansoni*, na fase intramolusco. Os resultados obtidos demonstram que em regiões mais alagadas e de clima mais ameno, o aumento de temperatura leva à dispersão da parasitose aumentando, portanto, as áreas de importância epidemiológica. No entanto, um aumento severo de temperatura, em locais onde essas já se encontram elevadas, causa a mortalidade dos moluscos levando por consequência o parasito à morte, o que impede a transmissão pelo estresse biológico sofrido por parasito e hospedeiro.

Os mesmos resultados foram obtidos por McCreesh e Booth (2014), utilizando *B. pfeifferi* (F. Krauss, 1848), principal molusco transmissor da esquistossomose na África subsaariana. Em adição, o estudo mostrou que alterações no tempo entre a postura e eclosão dos juvenis e seu desenvolvimento em adultos serão encurtados em locais com aumento de temperatura. Os autores também discutem que embora haja locais onde a parasitose poderá ser erradicada por esse aumento excessivo de temperatura, os locais onde ainda não ocorre a parasitose, ou esta ocorra em baixa frequência, pelas baixas temperaturas atuais, merecem atenção e monitoramento constante para evitar a formação de novos focos de transmissão gerados por esse desequilíbrio ambiental.

Giovanelli et al. (2005) e Palasio et al. (2015) atentam para importância superior da pluviosidade sobre a temperatura ao analisar a dinâmica populacional de moluscos límnicos. Ambos observaram em seus estudos uma redução drástica da população de *B. tenagophila* (respectivamente nos Estados do Rio de Janeiro e São Paulo) em estação chuvosa no local de estudo. No primeiro estudo as cheias da coleção hídrica favoreceram o aumento populacional de *Melanoides tuberculata* (Müller, 1774), competidor de *B. tenagophila*, causando uma pressão seletiva. No segundo estudo é sugerido que o aumento das cheias, causado pelo aumento da pluviosidade, levou à dispersão da população de *B. tenagophila* do local.

Ambos os autores também concordam que a instabilidade ambiental, principalmente relacionada às cheias e secas das coleções hídricas, causam impacto direto na população de moluscos. O aumento da temperatura ainda favorece *B. straminea* que por estar mais adaptada a essas alterações climáticas, vem sendo registrada em mais

municípios, onde anteriormente *B. tenagophila* era a única espécie registrada (PALASIO et al., 2015).

1.6- Morfologia e Biologia Molecular de *Biomphalaria tenagophila*

A concha de *B. tenagophila* pode chegar a 35 mm de diâmetro embora a grande maioria complete seu estágio de vida chegando no máximo a 25mm. A concha apresenta o lado esquerdo mais côncavo que o direito (Figura 7). Se comparada à concha de *B. glabrata*, apresenta maior largura, com uma abertura mais larga do que alta. Em uma análise anatômica, a semelhança com *B. glabrata* é acentuada, diferindo apenas pela crista renal que está ausente em *B. tenagophila* (PARAENSE, 2008).

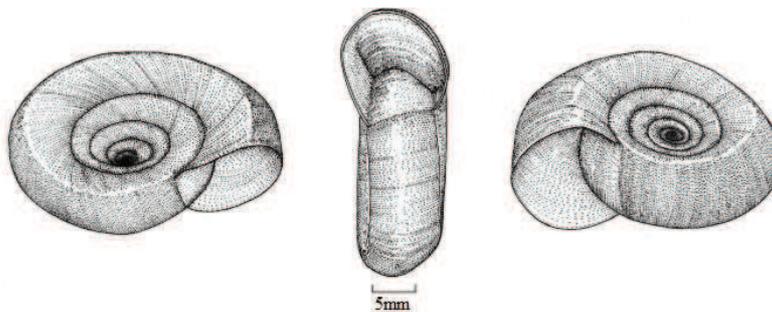


Figura 7: Concha de *Biomphalaria tenagophila*. Fonte: Paraense, 2008.

Como característica comum aos pulmonados, esses planorbídeos são hermafroditas apresentando o ovotestis, órgão responsável pela produção de células germinativas masculinas e femininas que serão conduzidas ao ovispermiduto. Este canal, ao sair do ovotestis emite divertículos que constituirão as vesículas seminais, local de amadurecimento dos espermatozoides. Em um novo estreitamento, desembocam no *carrefour* (também chamado de encruzilhada genital) onde receberão a secreção da glândula de albume, que envolverá o ovo. O *carrefour* é o ponto de divisão do sistema genital. A partir dele haverá o ramo feminino, dividido em glândula de albume, oviduto, glândula nidamental, útero, vagina e spermateca e o ramo masculino, dividido em canal espermático, próstata, canal deferente e complexo peniano (Figura 8) (PARAENSE & DESLANDES, 1955; PARAENSE, 2008).

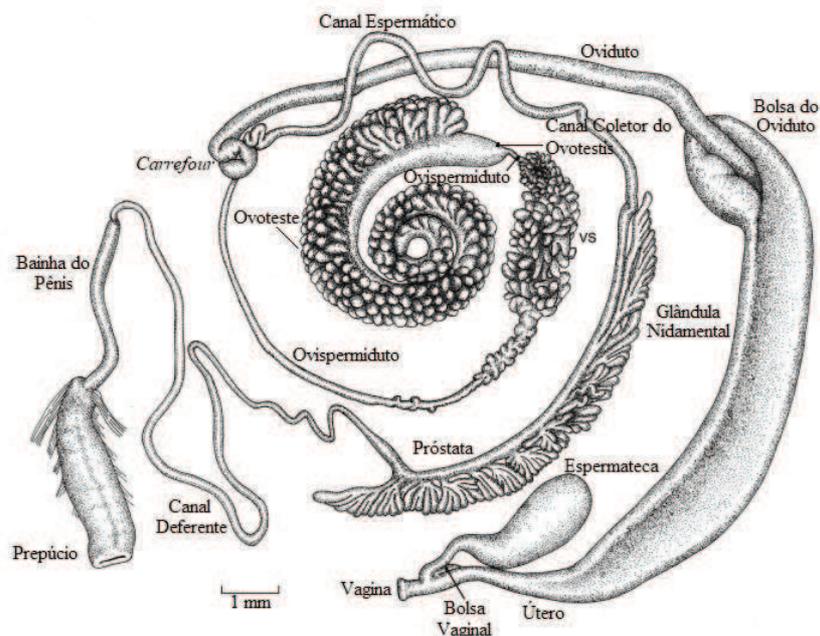


Figura 8: Sistema genital de *Biomphalaria tenagophila*. Fonte: Paraense, 2008 (Adaptado).

A cavidade pulmonar é extremamente vascularizada e percorre o tubo renal longitudinalmente, com a veia pulmonar à direita e a veia renal à esquerda. O sistema digestivo é formado pelo saco bucal, com a rádula e glândulas salivares, esôfago, estômago, glândula digestiva e intestino (PARAENSE & DESLANDES, 1955; PARAENSE, 2008).

Devido à grande similaridade entre as espécies do gênero *Biomphalaria*, apenas a análise morfológica dificulta o processo de identificação de cada uma delas. Com isso, técnicas moleculares começaram a ser empregadas de modo a auxiliar os pesquisadores, quando a análise morfológica não atinge sozinha o sucesso na identificação. O uso de ferramentas moleculares não exclui as técnicas morfológicas, porém juntas, e corretamente empregadas, são capazes de atingir tal objetivo (PARAENSE, 2008).

Para diferenciação de espécies do gênero, a técnica mais bem empregada é a PCR-RFLP (*Polimerase Chain Reaction -Restriction Fragment Length Polymorphism*: reação em cadeia da polimerase associada ao polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição). Por PCR, a região espaçadora transcrita interna (*Internal transcribed spacer - ITS*) do DNA ribossomal (rDNA) é amplificada. Para isso, os iniciadores se anelam nas regiões conservadas da porção final da subunidade 18S e na inicial da 28S, gerando um fragmento de 1300 pb que posteriormente, por digestão com a enzima de restrição *DdeI*, formam os perfis específicos (BARBOSA et al., 2006; CALDEIRA et al., 2016; ROSA et al., 2004; VIDIGAL et al., 1998; VIDIGAL et al., 2000).

Em *B. tenagophila*, o perfil é composto pelos fragmentos de 800 e 470 pb, exceto para a linhagem do Taim onde é acrescido o fragmento de 350 pb, que o torna um marcador molecular em estudos de populações com inserção desse patrimônio genético (BARBOSA et al., 2006; MARQUES et al., 2014; ROSA et al., 2004).

Recentemente, novas pesquisas com intuito de sequenciar o DNA mitocondrial (mtDNA) dos moluscos desse gênero vem sendo conduzidas. O mtDNA tem permitido desvendar vários aspectos da evolução de organismos e de seus genomas, além de permitir a discriminação de espécies e estudos de genética de populações (GOLVEIA, 2010). Estão disponibilizadas no GenBank sequências completas do mtDNA de *B. glabrata* e *B. tenagophila* e sequências parciais de *B. straminea* (DJONG et al., 2004; GOLVEIA, 2010; JANNOTTI-PASSOS, 2007; JANNOTTI-PASSOS et al., 2010).

Novas pesquisas estão ampliando os resultados sobre o controle da esquistossomose mediada pelos moluscos. Adema et al. (2017) concluíram o sequenciamento do genoma completo de *B. glabrata*, indicando que os próximos passos serão voltados para o sequenciamento completo também de *B. tenagophila*. Esse sequenciamento é crucial para a definição dos genes responsáveis pela suscetibilidade das espécies de *Biomphalaria* ao *S. mansoni*

1.7- A linhagem do Taim

A espécie *B. tenagophila* apresenta uma linhagem que tem sido estudada por diversos pesquisadores. Essa linhagem é formada por uma população melânica, coletada na Estação Ecológica do Taim, no Rio Grande do Sul, próximo à fronteira com o Uruguai. Os primeiros estudos demonstraram que tal linhagem se mostrou 100% resistente, não ocorrendo eliminação de cercárias, quando submetida a uma infecção em massa com a cepa LE ou com 10 miracídios da cepa SJ, ambas de *S. mansoni* (SANTOS et al., 1979). Além disso, em cruzamentos com a linhagem suscetível (Belo Horizonte-MG), a geração F1 apresentou apenas 4,1% de suscetibilidade, já indicando um caráter de dominância quanto a resistência à infecção.

Os estudos de investigação do sistema interno de defesa desses moluscos foram iniciados por Bezerra et al. (1997). Diferente dos mamíferos, esse sistema é composto apenas por componentes humorais, denominado fatores solúveis da hemolinfa, e pelos

hemócitos que realizam a ação fagocitária. Através de técnicas específicas foi possível quantificar a população de hemócitos circulantes na hemolinfa de linhagens suscetíveis e resistentes de *B. tenagophila* e *B. glabrata* além de observar a atividade fagocitária das mesmas. Os autores puderam inferir que a resistência das linhagens é definida logo nas primeiras horas de penetração dos miracídios no tecido dos moluscos, quando os hemócitos migram da hemolinfa para a região tecidual. Além disso, em linhagens resistentes, fatores solúveis como a lectina, proporcionam o reconhecimento de membrana hemócitos/miracídios e o sucesso na destruição do invasor.

Com o propósito de avaliar o potencial do sistema interno de defesa da linhagem do Taim, Bezerra et al. (2003), utilizaram radiação Gama para avaliar se a ação desse sistema seria bloqueada, sob alta radiação com ^{60}Co , facilitando assim o desenvolvimento dos miracídios e sua diferenciação em cercárias. O estudo confirmou a eficácia dos hemócitos que não apresentaram alterações, além de novamente serem capazes de impedir o desenvolvimento de esporocistos e cercárias dentro dos hospedeiros infectados.

Após resultados indicando a semelhança no comportamento de hemócitos de *Biomphalaria* sp. e macrófagos de mamíferos, foi inoculada sílica em duas linhagens de *B. tenagophila* (Cabo Frio-RJ e Taim) com o objetivo de reduzir a população de hemócitos circulantes na hemolinfa e analisar um possível aumento na suscetibilidade ao *S. mansoni*. Como esperado, houve redução significativa de hemócitos na hemolinfa, de modo que a linhagem de Cabo Frio se tornou mais suscetível. Na linhagem do Taim foi possível observar que a redução de hemócitos não alterou a resistência, indicando que outros fatores estão associados a esse comportamento (MARTINS-SOUZA et al., 2003).

Com esse sistema interno de defesa altamente eficiente, capaz de impedir o desenvolvimento de *S. mansoni* no hospedeiro, grupos de pesquisas iniciaram a tentativa de transmitir essa resistência do Taim para as linhagens de *B. tenagophila* suscetíveis. Coelho e Bezerra (2006) e Pereira et al. (2008) retiraram os hemócitos da hemolinfa de espécimes do Taim e inocularam em moluscos da linhagem de Cabo Frio. Os autores concluíram que fatores solúveis da mesma conferiram resistência a uma linhagem suscetível.

Barbosa et al. (2006) transplantaram, da linhagem Taim para a linhagem Cabo Frio, o órgão hematopoiético (*Amebocyte-Producing Organs*), denominado APO, responsável pelo desenvolvimento dos hemócitos. O objetivo foi averiguar se essa última linhagem era capaz de reduzir a suscetibilidade ao receber o APO da linhagem resistente. Como esperado, nos espécimes onde o transplante foi realizado com sucesso, houve um

aumento da resistência e a hipótese de que hemócitos produzidos pelo APO transplantado, já no molusco receptor, estariam realizando a destruição dos miracídios.

A fim de compreender mais intimamente o mecanismo de defesa da linhagem, a função das lectinas foi detalhada mais profundamente (MARTINS-SOUZA et al., 2006; MARTINS-SOUZA et al., 2009; MARTINS-SOUZA et al., 2011). Essas são produzidas por hemócitos e podem ser lançadas na hemolinfa ou expressas na superfície de hemócitos circulantes. Nessa última forma, as lectinas terão como função o reconhecimento celular e a fagocitose de estruturas não-próprias do organismo. Essas funções podem estar mais ou menos desenvolvidas em diferentes linhagens de *B. glabrata* e de *B. tenagophila*, estando intimamente associadas ao caráter de resistência. Com metodologia específica, através de marcação por fluorescência, o estudo permitiu inferir que a redução de hemócitos circulantes na hemolinfa, que ocorre de forma intensa apenas na linhagem do Taim, está relacionada ao reconhecimento celular do parasito. Além disso foi possível observar que a migração desses hemócitos para o local da infecção não é um comportamento observado em linhagens suscetíveis.

Nacif-Pimenta et al. (2012), utilizaram as mesmas linhagens para analisar esse comportamento dos hemócitos que migram para a região de infecção. Após uma hora da penetração dos miracídios foi possível observar, em ambas as linhagens, a ação dos hemócitos e a formação de células fibrosas contornando o parasito. Após cinco horas de observação, as células de defesa da linhagem de Cabo Frio já não mais interferiam no desenvolvimento dos esporocistos. Em contrapartida, na linhagem do Taim, foi observada uma intensa reação tecidual com espessa camada de células fibrosas e o aparecimento de resíduos celulares, provenientes dos miracídios, que após dez horas eram completamente destruídos.

Utilizando a região espaçadora interna do DNA ribossomal, através das técnicas de PCR-RFLP, como já mencionado, é possível definir, o perfil molecular das espécies do gênero *Biomphalaria* (CALDEIRA et al., 2016; CARVALHO et al., 2008; VIDIGAL et al., 1998). Para *B. tenagophila* do Taim o perfil é composto pelos fragmentos típicos de *B. tenagophila*, 800 e 470 pb além de um fragmento de 350 pb. Esse perfil diferenciado permite que seu patrimônio genético possa sempre ser monitorado uma vez que apresenta o caráter de dominância, seguindo segregação mendeliana, sendo também transmitido aos descendentes, quando da fecundação cruzada com uma linhagem suscetível (BARBOSA et al., 2006; ROSA et al., 2004).

Quanto à suscetibilidade dos descendentes gerados do cruzamento de uma linhagem suscetível (Joinville-SC) com a linhagem do Taim, foi obtida uma geração F1

resistente à infecção, enquanto na F2, apenas 7,2% se mostraram positivos (ROSA et al., 2005). Além disso, esses apresentaram uma baixa proporção de cercárias eliminadas, se comparados a descendentes de populações puramente suscetíveis. Esses dados foram confirmados em um estudo posterior onde 100% dos descendentes da F1 se mostraram resistentes e apenas 5% da F2 foram suscetíveis (ROSA et al., 2006).

Após vários estudos foi possível concluir que a resistência dessa linhagem está ligada a fatores genéticos e ao seu sistema interno de defesa altamente eficiente, o qual impede o desenvolvimento do parasito, e não a uma incompatibilidade com qualquer cepa de *S. mansoni*. A junção desses fatores à presença do marcador molecular da linhagem deu início a uma nova linha de pesquisa. A introdução em larga escala de espécimes resistentes, onde há apenas linhagens de *B. tenagophila* suscetíveis, criou uma promissora forma de controle biológico.

1.8- Controle Biológico

O controle de moluscos pode ser realizado pela aplicação de moluscidas ou através de medidas ambientais ou biológicas. Os moluscidas são compostos químicos sintéticos ou de origem natural, sendo este último mais recente e ainda em estágio de pesquisa através da investigação do princípio ativo de alguns vegetais. Para que um moluscida seja considerado eficiente é necessário que vários testes sejam realizados e suas especificações conhecidas e aprovadas para posterior padronização. Dessa forma sua utilização deve ser rigorosamente regulamentada a fim de impedir riscos à saúde e ao ambiente (COELHO & CALDEIRA, 2016; TELES & CARVALHO, 2008; WHO, 2017).

Embora diversos extratos vegetais e compostos sintéticos venham sendo testados (LARDANS & DISSOUS, 1998; TELES & CARVALHO, 2008), atualmente, o único moluscida recomendado pela Organização Mundial de Saúde é a Niclosamida (WHO, 2017). Sua aprovação e utilização são regulamentadas e seu potencial confere considerável diminuição da população de moluscos bem como de miracídios e cercárias livres na coleção hídrica.

Porém, em análise temporal, seu uso se torna ineficaz uma vez que a densidade populacional de moluscos pode ser rapidamente recuperada, devido ao seu baixo efeito residual, através da reprodução dos sobreviventes e do pouco efeito gerado sobre as desovas presentes durante a aplicação do produto, de modo que para evitar a criação de um ambiente propício a continuidade do ciclo do parasito, faz-se necessária sucessivas

aplicações do composto. (BRASIL, 2008; COELHO & CALDEIRA, 2016; TELES & CARVALHO, 2008).

Soma-se a essa ineficiência os resultados de um estudo realizado no nordeste brasileiro onde a prevalência da esquistossomose, transmitida por *Biomphalaria straminea*, ocorre naturalmente após aplicação da Niclosamida. Esses planorbídeos, no local estudado, já se apresentam resistentes ao composto, além de realizarem o comportamento de abandonar a coleção hídrica quando da aplicação do produto, reduzindo significativamente a mortalidade populacional (SARQUIS, PIERI & SANTOS, 1997).

A ação não-seletiva da Niclosamida também gera resultados preocupantes. É demonstrado em estudos, com a aplicação desse composto, que a fauna associada ao ecossistema límnic é reduzida, assim como ocorre com os moluscos, de modo que seu uso indiscriminado pode acarretar o impacto ambiental. Portanto, seu uso é recomendado apenas em focos isolados de áreas urbanas ou rurais onde o efeito positivo sobre a redução de casos de doentes seja maior que os impactos ambientais causados pela droga (BRASIL, 2008; TELES E CARVALHO, 2008).

Métodos alternativos à aplicação de moluscidas foram estudados com o objetivo de aumentar o controle sobre esses hospedeiros intermediários. Propostas de controle biológico com a introdução de predadores (como peixes e hirudíneos), (ANDRADE, 1979; GUIMARÃES et al., 1983; WEINZETTL & JUBERG, 1990) e moluscos competidores (BARBOSA et al., 1993; POINTIER & McCULLOUGH, 1989; POINTIER, 1993), bem como parasitos com potencial para castração parasitária (LARDANS & DISSOUS, 1998), foram utilizados como metodologia de redução populacional dos planorbídeos. Todos esses métodos foram questionados acerca de sua eficácia, seja pelo impacto ambiental gerado pela introdução de espécies, muitas vezes exóticas no local introduzido, seja pela custosa e dificultada operação no levantamento da criação em larga escala, de um competidor ou de um predador.

Soma-se a esses dados, o fato de alguns competidores também atuarem como hospedeiros intermediários de parasitos nocivos ao homem ou a outros vertebrados locais. Além disso, trabalhos já observaram o equilíbrio entre as populações inseridas e os moluscos, permitindo a convivência após um longo tempo (TELES & CARVALHO, 2008).

Após a descoberta da linhagem de *B. tenagophila* do Taim, uma nova proposta de controle biológico está em andamento. Os estudos utilizam tal linhagem, resistente ao *S. mansoni*, para introdução em larga escala em locais onde essa espécie é a única

transmissora da esquistossomose (COELHO et al., 2004; COELHO et al., 2008; MARQUES et al., 2014; ROSA et al., 2013).

Neste caso, o uso de uma população intraespecífica, não caracterizando competição ou predação, tem por objetivo transmitir aos moluscos locais o caráter dominante da resistência através de cruzamentos (COELHO et al., 2008).

Para o desenvolvimento dessa promissora linha de pesquisa, inicialmente, foi realizado um levantamento malacológico detalhado para mapear os locais onde apenas *B. tenagophila* estava presente. Esse trabalho foi realizado em parceria com diversos pesquisadores, juntamente com a Superintendência de Controle de Endemias da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo (SUCEN) (TELES, 1989; TELES & MARQUES, 1989; TELES et al., 2002^a; TELES et al., 2002^b; TELES, 2005).

Os primeiros locais de introdução foram os municípios de Bananal e Caraguatatuba no Estado de São Paulo. No Município de Bananal, ocorreu a concessão de uma área para criação em larga escala da linhagem do Taim. Nesse local, denominado “Chácara Santa Inês” foi possível a construção de tanques, com circulação hídrica e controle de temperatura, além de um sistema com proteção para evitar entrada de culicídeos, e a fuga de moluscos (COELHO et al., 2008; ROSA et al., 2013).

Delineada toda a metodologia, em julho de 2010 foi escolhida uma coleção hídrica isolada, localizada no interior de uma fazenda de propriedade privada, para realizar a introdução de oitocentos espécimes da linhagem resistente. Os resultados foram bastante favoráveis, com descendentes coletados após 14 meses da introdução da linhagem do Taim apresentando o marcador de 350 pb em 60% da população amostral. Além disso, a suscetibilidade dessa população caiu de 38,6% para 2,1% (MARQUES et al., 2014).

As perspectivas são de que este modelo possa representar uma alternativa para o controle da transmissão da esquistossomose. Porém é necessário investigar o desenvolvimento da população de *B. tenagophila* do local onde ocorreu a introdução da linhagem do Taim por mais tempo, a fim de averiguar se o seu patrimônio genético continua na população e se este aumentou a resistência da população local.

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo Geral

Avaliar a eficácia da linhagem de *B. tenagophila* do Taim como modelo de controle biológico da transmissão da esquistossomose após 40, 52 e 64 meses da sua introdução em uma coleção hídrica do município de Bananal SP onde há apenas essa espécie de *Biomphalaria*.

2.2- Objetivos Específicos

- Acompanhar os níveis de suscetibilidade ao *S. mansoni* dos descendentes coletados da população de *B. tenagophila* do Córrego Herivelto Martins entre os anos de 2013 e 2015;
- Analisar a frequência do marcador molecular de 350 pb na população descendente de espécimes coletados no campo, que foram utilizados nos testes de suscetibilidade.

3- INTRODUÇÃO

Os hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 são os moluscos da família Planorbidae, do gênero *Biomphalaria* Preston, 1910. No Brasil, há onze espécies e uma subespécie, mas somente *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), *Biomphalaria tenagophila* (d'Orbigny, 1835), e *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) são encontradas na natureza eliminando cercárias desse helminto (PARAENSE, 1972; TEODORO, 2009).

A espécie *B. tenagophila* é a segunda em importância na transmissão da esquistossomose no Brasil, sendo a principal em focos do Estado de São Paulo (TELES, 1989; TELES et al., 2002; TELES, 2005) e em focos isolados da parasitose nos estados de Minas Gerais e Santa Catarina (CARVALHO et al., 1985; COELHO et al., 2008; MELO & PEREIRA, 1985; SILVA et al., 1994). Nessa espécie existe uma variação quanto ao grau de resistência ao parasito, sendo encontradas desde linhagens altamente suscetíveis, até completamente resistentes quando expostos às diferentes cepas geográficas de *S. mansoni* (CORREA et al., 1979; PARAENSE & CORRÊA 1978).

Dentre essas linhagens, existe uma coletada há 38 anos na Estação Ecológica do Taim, no Rio Grande do Sul, que se mostra completamente resistente ao *S. mansoni* e vem sendo investigada por diversos pesquisadores há várias décadas. Essa linhagem permanece resistente em todas as idades, à elevadas cargas parasitárias e à todas as cepas do *S. mansoni* utilizadas em testes de suscetibilidade até o momento (BARBOSA et al., 2006; COELHO et al., 2008; MARQUES et al., 2014; MARTINS-SOUZA et al., 2003; MATTOS et al., 2011; NACIF-PIMENTA et al., 2012; NEGRÃO-CORREA et al., 2012; ROSA et al., 2005; SANTOS et al., 1979; SILVA-NETO et al., 2014).

A resistência dessa linhagem é explicada principalmente por essa apresentar um sistema interno de defesa extremamente eficiente. Esse sistema conta com a participação ativa dos hemócitos que causam uma intensa reação celular logo nas primeiras horas após a penetração dos miracídios, levando-os à morte antes mesmo de sua diferenciação em esporocistos e cercárias (BEZERRA et al., 1997; BEZERRA et al., 2003; NACIF-PIMENTA et al., 2012; NEGRÃO-CORREA et al., 2012).

Os ensaios conduzidos em laboratório comprovaram que o caráter da resistência dessa linhagem é dominante e pode ser transmitido a outras linhagens suscetíveis por meio de cruzamentos (FREITAS et al., 1985; ROSA et al., 2005; SANTOS et al., 1979).

A técnica mais utilizada para identificação molecular dos planorbídeos é a PCR/RFLP (*Polymerase Chain Reaction/ Restriction Fragments Length Polymorphisms*).

O DNA é submetido a PCR utilizando os iniciadores ETTS2 e ETTS1 que ancoram nas extremidades conservadas do gene ribossomal (respectivamente 18S e 28S) e amplificam a Região Espaçadora Interna (ITS) do DNA ribossomal (KANE & ROLLISON, 1994). Posteriormente a RFLP, utilizando a endonuclease de restrição *DdeI*, evidencia uma peculiaridade na linhagem do Taim. Seu perfil molecular com três fragmentos (800, 470 e 350 pb), difere de outras populações da mesma espécie que possuem apenas os dois primeiros fragmentos (BARBOSA et al., 2006; CALDEIRA et al., 2016; ROSA et al., 2004). Esse fragmento de 350 pares de base é típico da linhagem do Taim e também possui caráter dominante. Embora não esteja associado à resistência, é uma ferramenta importante para identificar a transmissão do patrimônio genético dessa linhagem (BARBOSA et al., 2006; MARQUES et al., 2014; ROSA et al., 2004).

Devido a importância da espécie de *B. tenagophila* na manutenção do ciclo *S. mansoni* no estado de São Paulo, um novo modelo de controle biológico na transmissão da esquistossomose está sendo testado em coleções hídricas do município de Bananal-SP. Esse modelo consiste na introdução, em larga escala, de espécimes da linhagem do Taim com a finalidade de transmitir a sua resistência às populações de *B. tenagophila* susceptíveis (COELHO et al., 2008).

Os primeiros ensaios no campo com essa linhagem foram conduzidos por Coelho et al. (2008) em várias coleções hídricas do município de Bananal-SP. Embora os resultados tenham sido promissores, em tal estudo não foi possível avaliar o impacto da linhagem resistente sobre a suscetibilidade da linhagem local. Portanto, em julho de 2010 uma outra área do município foi selecionada, ocorrendo nova introdução da linhagem do Taim. Após 14 meses, foi possível verificar que o caráter da resistência foi transmitido com sucesso aos indivíduos da população suscetível (local), uma vez que a taxa de suscetibilidade foi reduzida de 38,6% para 2,1%. Além disso, o marcador de 350 pb estava presente em 60% dos indivíduos analisados (MARQUES et al., 2014).

Diante dos resultados, as perspectivas são de que esse modelo represente uma alternativa para o controle na transmissão da esquistossomose onde *B. tenagophila* seja a única espécie transmissora. Entretanto, a transferência do caráter resistência da linhagem do Taim à linhagem suscetível deve ser acompanhada durante maior período de tempo.

Sendo assim, o presente trabalho avalia aspectos moleculares, incluindo a proporção da população que se mantém com o fragmento de 350 pb, bem como a suscetibilidade dos descendentes dessa população, quando expostos ao *S. mansoni*, após 3 a 5 anos da introdução da linhagem do Taim.

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Área de Estudo

O município de Bananal possui 616,4 km² de área e uma população de 10821 habitantes e está localizado no extremo leste do Estado de São Paulo. Juntamente com os municípios Arapeí, Areias, Queluz, São José do Barreiro e Silveiras, forma o Circuito Histórico do Vale do Paraíba. Os acessos ocorrem pela Rodovia Presidente Dutra, BR-116, Estrada da Bocaína, SP-247, Rodovia dos Tropeiros, SP-068, e Rodovia Resgate, SP-064 (IBGE, 2016).

O local de introdução da linhagem do Taim foi escolhido por Marques (2012) com base principalmente no levantamento malacológico, intensidade da correnteza e dificuldade de acesso, para evitar fluxo intenso de pessoas, que pudessem comprometer o desenvolvimento do experimento. Após tais análises, foi definido como local de estudo uma coleção hídrica neotropical denominada pela população como córrego Herivelto Martins (latitude 22°43'706" e longitude 44°21'409"). Localizado em uma propriedade particular no bairro Santo Antônio do Retiro, o córrego possui 580 metros de comprimento e 1,5 metros de largura, podendo sua profundidade chegar a 1,5 metros, dependendo das condições pluviométricas. Sua foz se encerra no córrego Scamping, um ecossistema lótico cuja foz desemboca no rio Bananal, que contorna todo o município. Próximo à foz do córrego Herivelto Martins deságua um brejo (área úmida), que também contém uma nascente (Figura 9).

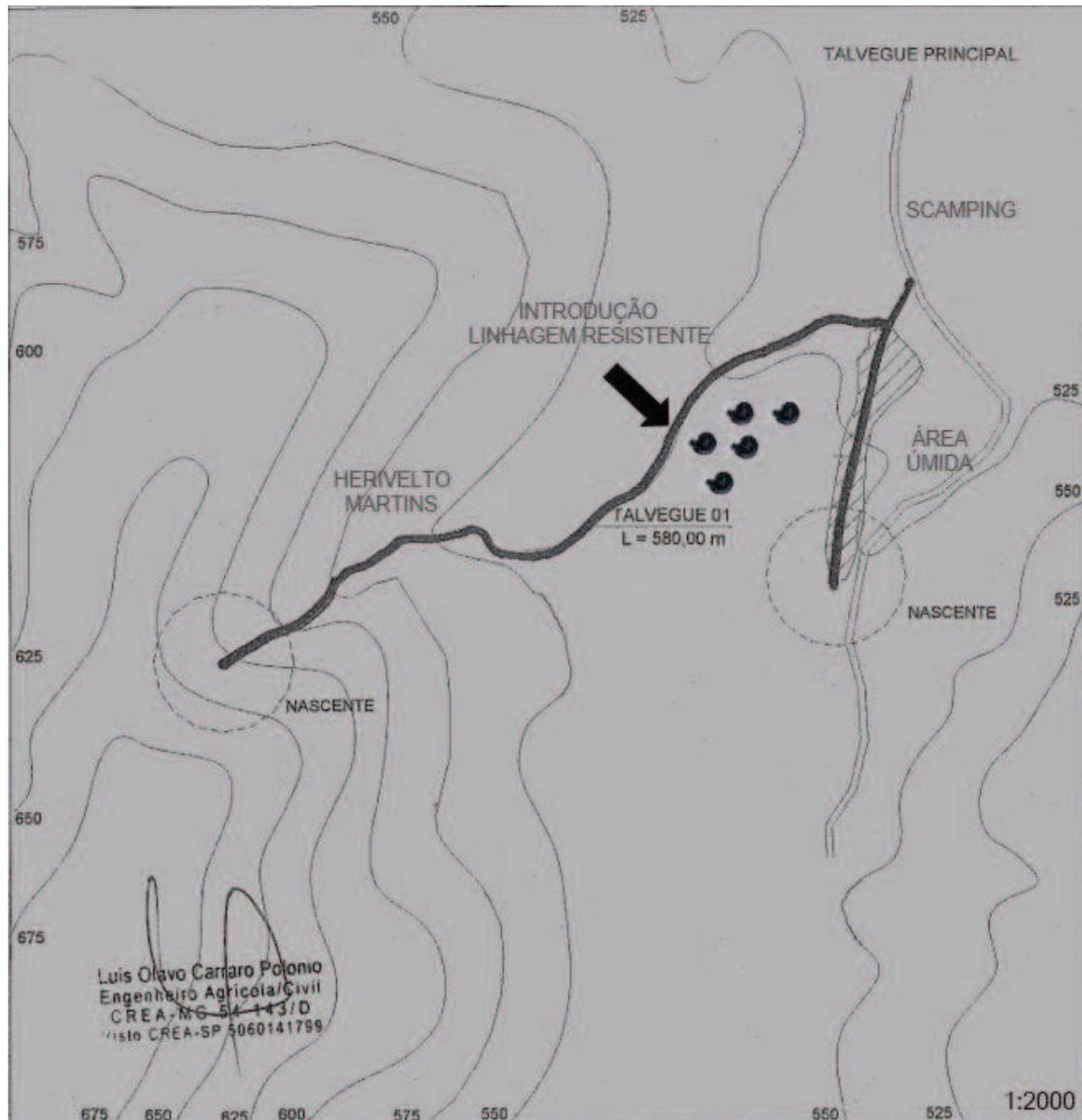


Figura 9: Córrego Herivelto Martins, Bananal SP, indicando o local da introdução da linhagem resistente do Taim, as nascentes do entorno e a foz desembocando no córrego Scamping. Escala 1:2000. Fonte: LO Carraro Engenharia e Construtora.

4.2- Coleta dos moluscos

As coletas foram realizadas durante o período de 2013 a 2015, exatamente após 40, 52 e 64 meses da introdução da linhagem Taim. Os moluscos foram coletados por três pesquisadores sempre no sentido foz-nascente, durante todo o dia, explorando também o córrego Scamping, onde deságua a coleção hídrica de estudo (Figura 10). Foi utilizado um coletor adaptado para moluscos límnicos, composto de tela de malha de 0,002 m com área de 0,03 m², fixado em cabo de madeira. Os moluscos foram retirados dos coletores

com pinças de madeira, acondicionados em caixas de transporte com gaze umedecida e encaminhados para o Laboratório de Parasitologia da UFJF, seguindo o protocolo do Ministério da Saúde (2008).



Figura 10: Coleta dos moluscos no córrego Herivelto Martins, Bananal SP. Fonte: Acervo pessoal

4.3- Identificação e exame parasitológico dos moluscos coletados

No laboratório, os moluscos coletados foram colocados individualmente em placas acrílicas de 12 poços com água desclorada a 26 °C. Em seguida, foram expostos à luz artificial por aproximadamente 4 horas, seguindo o protocolo do Ministério da Saúde (2008). Esta técnica promoveu condições ideais de temperatura e luminosidade para identificar os planorbídeos que pudessem estar infectados com cercárias de algum trematódeo, provenientes do campo.

Cinco moluscos, de cada coleta, também foram mortos e dissecados seguindo o protocolo de Paraense & Deslandes (1955). Para isso, foram anestesiados com pentobarbital sódico a 0,05% por 12 horas, seguido de choque térmico em água declorada a 10 °C e posteriormente a 70 °C por 40 segundos. Com uma pinça, a parte mole foi retirada da concha e fixada em solução de Railliet-Henry, modificada para moluscos límnicos, e trocada de 24 em 24 horas por duas vezes.

A confirmação morfológica da espécie foi realizada depositando o planorbídeo fixado em uma placa de petri e manipulando-o com duas pinças. A dissecação consistiu em remover o manto para a análise da crista renal e do complexo peniano.

4.4- Manutenção dos Moluscos em laboratório

Os moluscos que foram coletados na coleção hídrica foram armazenados em caixas de plástico de 12 litros. Esses constituíram a geração parental de onde foram obtidos os descendentes utilizados nos testes. Os recipientes foram preenchidos com água declorada, que eram trocadas pelo menos duas vezes por semana. Além disso, para conferir a oxigenação contínua da água e temperatura adequada, foram adicionados um aerador e um termostato controlado a 26 °C (Figura 11).

A alimentação dos moluscos foi alternada entre alface fresca e ração para moluscos límnicos padronizada por Freitas (1973). Para auxiliar na formação e boa condição da concha também foi adicionado Carbonato de Cálcio ao recipiente.

Para a coleta de descendentes foram inseridos substratos de isopor. Após serem preenchidos com as desovas, esses isopores eram transferidos para novos recipientes. Os recém-eclodidos foram alimentados com a ração de moluscos límnicos e mantidos em BOD (*Biochemical Oxygen Demand*), com temperatura controlada a 26° C.



Figura 11: Caixa de plástico com aerador, termostato e isopor para desovas contendo moluscos coletados no campo. Fonte: Acervo pessoal.

4.5- Parasito

A cepa do parasito, utilizada em todos os testes de suscetibilidade do presente estudo, foi a SJ de *S.mansoni*. Essa foi isolada em 1960 de *B. tenagophila* coletados em São José dos Campos-SP, localizado no vale do Rio Paraíba, e vem sendo mantida em infecções de hamsters *Mesocricetus auratus* Waterhouse, 1839 e *B. tenagophila*, com passagens esporádicas em *B. glabrata*. Esta cepa foi fornecida pelo Moluscário Lobato Paraense/CPqRR que mantém a linhagem desde então, através da técnica descrita por Pellegrino & Katz (1968).

4.6- Grupos experimentais dos testes de infecção

Para avaliar o efeito da introdução da linhagem resistente sobre a suscetibilidade da população de *B. tenagophila*, coletada 40 e 64 meses após a intervenção, os seus respectivos descendentes, com medidas entre 5 e 8 mm de diâmetro, foram desafiados com cepa SJ.

Além disso, descendentes dos espécimes coletados antes da introdução da linhagem do Taim que, portanto, não tiveram contato com o patrimônio genético resistente, foram utilizados para compor o grupo controle. Espécimes de *B. glabrata*

compuseram um outro grupo para confirmar a viabilidade do teste de infecção. Esses também apresentavam medidas entre 5 e 8 mm de diâmetro.

Os moluscos utilizados no teste foram transportados para o Centro de Pesquisas René Rachou. Para obtenção de miracídios, de acordo com a técnica descrita por Pellegrino & Katz (1968), *M. auratus* foram mortos e tiveram seus fígados devidamente triturados com solução salina a 0,85%. Essa solução foi mantida em cálice escuro por 30 minutos e, posteriormente, lavada com água declorada. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o sedimento inserido em um balão de fundo chato, com fundo preto e parte superior transparente, com adição de água declorada com temperatura a 28° C e iluminação por luz artificial, conforme ilustrado na figura 12. Esse procedimento permitiu a eclosão dos miracídios dos ovos e, por fototropismo positivo, a migração dos mesmos para a região transparente do balão de fundo chato.



Figura 12: Cálice escuro contendo fígados de hamsters macerados em solução salina e balão de fundo chato com borda transparente em luz artificial para migração dos miracídios. Fonte: Acervo pessoal

Os miracídios foram contados sob microscópio estereoscópio e posteriormente, para cada um dos poços de placas acrílicas, foram transferidos em número de 25. Em seguida, cada molusco foi inserido em um poço e o volume de cada um foi completado com água declorada.

As placas foram identificadas e expostas à luz artificial incandescente por 4 horas, de forma a assegurar a luminosidade e a temperatura adequada da água para a infecção dos moluscos. Após a infecção, os moluscos foram transportados novamente para o Moluscário do Laboratório de Parasitologia da UFJF.

Entre o período de 28 a 60 dias, com intervalos semanais, os espécimes submetidos aos testes foram expostos à luz artificial por 4 horas em água deionada a 28 °C, para verificar a eliminação de cercárias de *S. mansoni*. Os grupos experimentais se encontram na tabela 1.

Tabela 1: Grupos experimentais de *Biomphalaria tenagophila* utilizados nos testes de infecção.

Testes de Infecção	Grupo de Moluscos	Número de moluscos expostos
1º Teste	Controle (Antes da Introdução)	55
	Pós Introdução (40 meses)	55
	<i>B. glabrata</i>	40
2º Teste	Controle (Antes da Introdução)	93
	Pós Introdução (64 meses)	48
	<i>B. glabrata</i>	48

4.7- Análise molecular

Os espécimes de *B. tenagophila* negativos e positivos, que sobreviveram após os testes de infecção, foram mortos e posteriormente tiveram a sua massa cefalopodal retirada para análise molecular. Em seguida, o DNA foi extraído, dosado e submetido as técnicas PCR-RFLP para detectar a presença do marcador molecular de 350 pb típico da linhagem do Taim. Além disso, a técnica também foi utilizada para detectar a observação de fragmentos de cercárias presentes nos moluscos positivos para o teste de infecção. A massa cefalopodal de um molusco da linhagem Taim também foi retirada, seguindo o mesmo protocolo, a fim de compor o controle do fragmento de 350 pb. Um *pool* de cercárias também tiveram seu DNA extraído para compor o controle dos fragmentos do parasito.

4.7.1- Extração de DNA de *Biomphalaria tenagophila*

O DNA dos moluscos foi extraído da massa cefalopodal usando o kit Wizard Genomic (Promega), seguindo o protocolo do fabricante, com algumas modificações (VIDIGAL et al., 2000). Em tubos tipo eppendorf de 2,0 mL, devidamente identificados, os tecidos foram rompidos em 200 μ L de solução de lise nuclear com 2 μ L de solução de Proteinase K, incubados a *overnight* em 37 °C. Posteriormente, em cada tubo, foram adicionados 80 μ L de solução de precipitação e agitados em vórtex por 30 segundos, seguido de centrifugação a 13000 rpm por 6 minutos. Com a deposição do sedimento escuro no fundo do tubo, o sobrenadante foi coletado com uma micropipeta e transferido para um novo tubo, devidamente identificado, contendo 200 μ L de isopropanol, para a precipitação do DNA. Esse conteúdo foi agitado por inversão durante 20 minutos e posteriormente centrifugado a 13000 rpm por 6 minutos. O sedimento claro de DNA foi lavado em 500 μ L de etanol absoluto gelado com adição de 10% de solução de acetato de sódio 3 M, pH=5,2 e incubado a -80 °C por duas horas. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 13000 rpm e tiveram seu sobrenadante descartado para última etapa de lavagem em 500 μ L de álcool a 70%. Essa solução foi centrifugada por 6 minutos a 13000 rpm e teve novamente o sobrenadante descartado. Os tubos contendo os sedimentos úmidos de DNA foram incubados em termociclador a 37 °C até a completa evaporação do etanol. A adição de 25 μ L de solução de reidratação, seguido por uma nova incubação a 37 °C no termociclador por 30 minutos, finalizou o processo. Todo o DNA extraído foi armazenado a -20 °C.

Para amplificação do produto de interesse, foi padronizada a concentração de 20 ng/ μ L de DNA. Para isso, 1 μ L de cada amostra foi dosada em um espectrofotômetro UV-Vis NanoDrop Lite e as devidas proporções para diluições foram calculadas.

4.7.2- Extração de DNA das cercárias de *Schistosoma mansoni*

Após o exame parasitológico, foi coletado um *pool* de cercárias proveniente dos moluscos positivos para o teste de infecção. Para isso, o líquido foi filtrado para remoção das fezes dos espécimes. O conteúdo (água e cercárias) foi transferido para tubos tipo falcon de 12 mL e centrifugado a 3400 rpm por 15 minutos. Posteriormente, os tubos

foram vertidos, para retirada do sobrenadante, o sedimento foi coletado com micropipeta e transferido para tubos tipo eppendorf de 2 mL.

O DNA das cercárias foi extraído usando o kit Wizard Genomic (Promega), seguindo o protocolo do fabricante, com as seguintes modificações: em tubos tipo eppendorf de 2,0 mL, devidamente identificados, os tecidos foram destruídos em 200 μ L de solução de lise nuclear com 2 μ L de solução de Proteinase K, incubados por duas horas a 37° C. A partir desse processo, o protocolo seguiu conforme a extração de DNA de moluscos mencionado em 4.7.1.

4.7.3- PCR

A amplificação por PCR ocorreu nas regiões espaçadoras internas do DNA ribossomal (ITS), utilizando os iniciadores ETTS2 (5'TAACAAAGGTTTCCGTAGGT GAA3') e ETTS1 (5'TGCTTAAGTTCAGCGGGT3'), ancorados respectivamente nas extremidades conservadas dos genes ribossomais 18S e 28S (KANE & ROLLINSON, 1994).

A amplificação ocorreu em um volume final de 10 μ L da solução MIX composta por 20 ng do DNA de cada amostra, juntamente com 1 μ L de cada um dos desoxirribonucleotídeos trifosfatados, 200 μ M, 0,3 μ L de $MgCl_2$, 1,5 mM, 0,8 unidades de Taq DNA polimerase, 1 μ L de cada iniciador (ETTS1 e ETTS2) 50 pM e 1 μ L de tampão de PCR composto por 50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl pH=8,5. O volume foi ajustado com água estéril. Os reagentes foram fornecidos pela Invitrogen, com exceção dos iniciadores que foram da empresa Ludwing Brasil. Uma amostra de controle negativo foi incluída em todas as reações contendo os reagentes acima, substituindo o DNA da amostra por água estéril na mesma proporção.

As condições de amplificação seguiram a desnaturação a 95 °C por 3 minutos, 32 ciclos de anelamento a 54 °C por 1 minuto, extensão a 72 °C por 2 minutos, desnaturação a 95 °C por 45 segundos e extensão final a 72 °C por 5 minutos. Os produtos amplificados foram estocados a -20 °C.

4.7.4- Eletroforese

Para confirmar a amplificação dos produtos de 1.300 pb, obtidos por PCR, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% em tampão de corrida TBE 1X, usando o sistema de gel BIO-RAD. Para isso, cada 3 µL do produto amplificado foi homogeneizado a 3 µL de solução tampão de amostra 2X (0,125% de azul bromofenol, 0,125% de xilenocianol e 15% de ficol) e aplicado em cada canaleta obtida com o gel. O mesmo tampão, na dosagem de 3 µL, também foi aplicado com 3 µL do padrão Phix-174 HaeIII (Invitrogen), para a comparação com padrão de peso molecular das amostras. Os géis foram submetidos a uma corrente de 100 Volts por 90 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foram corados pela solução de nitrato de prata para visualização dos fragmentos de interesse.

O protocolo de coloração foi descrito por Sanguinetti et al. (1994) e Liang et al. (2014) e consistiu em agitar vigorosamente o gel por 10 minutos em 150 mL de solução fixadora contendo 0,75 mL de ácido acético, 15 mL de etanol absoluto e 150 mL de água deionizada. Posteriormente, foram adicionados 1,5 mL de solução de nitrato de prata a 10% e mantido em agitação por 5 minutos. O conteúdo foi vertido e cada gel foi lavado em 150 mL de água deionizada por duas vezes. Finalmente, o gel foi mergulhado e agitado em solução reveladora contendo 150 mL de água deionizada, 1,5 mL de hidróxido de sódio e 450 µL de formaldeído para observação dos fragmentos amplificados.

4.7.5- RFLP

Os produtos obtidos por PCR, com 1.300 pb, foram submetidos à restrição com a enzima *DdeI* (Invitrogen), para evidenciar os fragmentos típicos da linhagem do Taim (800, 470 e 350 pb), e os das demais linhagens de *B. tenagophila*, (800 e 470 pb), além dos fragmentos de cercária de *S. mansoni* (aproximadamente 600, 310 e 100 pb). A restrição ocorreu com o restante do material amplificado, 7 µL, diluído em água estéril em proporção de acordo com a intensidade do perfil de fragmentos produzido no gel de PCR. Desse material diluído, 10 µL foram transferidos para um novo tubo eppendorf, adicionando-se 0,5 µL (cerca de 4 a 8 unidades) da enzima *DdeI* e 1 µL do tampão fornecido pelo fabricante, formando um volume final de 11,3 µL. O material foi colocado

em um termociclador por 3 horas e 30 minutos a 37 °C, seguido de um ciclo de 20 minutos a 80 °C. Os produtos foram estocados a -20 °C.

Após a reação um novo gel, seguindo o mesmo padrão descrito em 4.7.4 foi realizado para verificar a formação dos perfis específicos.

4.8- Comitê de Ética e autorização de coleta

O uso dos hamsters *M. auratus* para a manutenção da cepa SJ no Moluscário Lobato Paraense/CPqRR foi autorizado pela Comissão de Ética no uso de animais (CEA) da Fundação Oswaldo Cruz, sob o número de protocolo, nº P-23/13-3 de 08/07/2013.

A autorização para coleta dos moluscos utilizados na pesquisa foi concedida pelo Ministério do Meio Ambiente/Instituto Chico Mendes de Conservação e Biodiversidade (ICMBio), sob o número 49182-1 com validade até 22/07/2016.

4.9- Análise Estatística

O teste do qui-quadrado foi utilizado para comparar a proporção de espécimes infectados no teste de suscetibilidade, dos grupos antes e após a introdução, com nível de significância de 5%. Os cálculos foram realizados utilizando o software Microsoft Office Excel 2016 (Microsoft, Redmond, Washington, EUA).

4.10- Dados Pluviométricos

Os dados pluviométricos foram coletados do banco de dados gerados pela estação pluviométrica D1-001 localizada em Bananal (Latitude -22° 41' 00"; Longitude -44° 19' 00" a 460 metros de altitude) do Departamento de Águas e Energia Elétrica (2011), pertencente a Secretaria de Saneamento e Recursos Hídricos do Estado de São Paulo. Foram analisadas as pluviometrias, em milímetros, de janeiro de 2010 a dezembro de 2015, de modo a englobar o período da introdução da linhagem resistente até a última coleta de monitoramento.

5- RESULTADOS

5.1- Local e Coleta

Os moluscos analisados nesse estudo foram coletados durante o período de 2013 a 2015 e os números de exemplares capturados se encontram na Tabela 2. Nenhum dos moluscos avaliados, após a intervenção, estavam eliminando cercárias de *S. mansoni* ou de outro trematódeo. A identificação morfológica evidenciou que todos os exemplares eram *B. tenagophila*. Durante as coletas foi observado que o nível de água do córrego Herivelto Martins estava muito baixo quando comparado com os anos anteriores.

Tabela 2: Número de espécimes de *Biomphalaria tenagophila* coletados no córrego Herivelto Martins, Bananal-SP, durante o período de 2013 a 2015.

Data da Coleta	Tempo pós Introdução	Nº de Moluscos
23/11/2013	40 meses	97
02/11/2014	52 meses	92
04/11/2015	64 meses	41
	Total de Moluscos	230

5.2- Testes de Infecção

5.2.1- Amostras de 2013

Os resultados do teste de infecção das amostras de 2013, estão sintetizados na Tabela 3. Dos 55 descendentes obtidos de moluscos coletados antes da introdução (grupo controle) e que foram infectados, 49 sobreviveram. Destes, 17 estavam eliminando cercárias (34,6%). Por outro lado, os 55 descendentes obtidos de moluscos coletados após 40 meses da introdução, quando submetidos à infecção apresentaram um total de 52 indivíduos sobreviventes e nove eliminando cercárias (17,3%). Os dados mostram que mesmo após 40 meses a suscetibilidade da população de *B. tenagophila* do córrego Herivelto Martins ainda

permanece significativamente diferente ($p=0.0457$) quando comparado com o grupo controle.

O grupo *B. glabrata*, utilizado para assegurar a viabilidade do teste de infecção, composto por 40 espécimes, apresentou alta mortalidade, com seis espécimes sobreviventes, sendo que cinco estavam positivos (83,3%).

Tabela 3: Número de descendentes positivos para o teste de infecção de espécimes de *Biomphalaria tenagophila* coletados no córrego Herivelto Martins, Bananal-SP, após 40 meses da introdução da linhagem do Taim-RS.

Teste de Infecção	Grupos	Nº de espécimes infectadas	Nº de sobreviventes	Sobreviventes Positivos	Valor de p
1º Teste	Antes da Introdução (controle)	55	49	17 (34,6%)	0.0457*
	Pós Introdução (40 meses)	55	52	9 (17,3 %)	
	<i>B. glabrata</i>	40	6	5 (83,3 %)	

* Diferença significativa entre espécimes coletadas antes e após 48 e 64 meses da introdução da linhagem do Taim ($p<0,05$). Teste do Qui-quadrado apropriado para proporções (variável categ. nominal)

5.2.2- Amostras de 2014

Em julho de 2015, 50 espécimes de cada grupo experimental foram submetidos a infecção. Em uma semana, houve mortalidade em massa e nenhum dos grupos apresentou espécimes sobreviventes para novo exame parasitológico. Devido à ausência de desovas e/ou descendentes gerados pelo grupo, não houve a possibilidade de repetir tal exame parasitológico.

5.2.3- Amostras de 2015

Na Tabela 4, encontram-se os resultados do teste de infecção das amostras de 2015. Dos 93 descendentes obtidos de moluscos antes da intervenção (grupo controle), que foram expostos ao parasito, apenas 47 sobreviveram e 32 estavam eliminando cercárias (68,08%). O grupo constituído por 48 descendentes de moluscos coletados após 64 meses da introdução, que foram submetidos ao teste de infecção, apresentaram 37 indivíduos sobreviventes e 15 positivos (40,54%). Ao comparar o grupo antes e pós

introdução, observa-se que existe uma diferença significativa entre ambos ($p=0,0115$), entretanto, ocorreu um aumento da suscetibilidade de ambos os grupos, quando comparados com os resultados dos anos anteriores. (Figura 13).

O grupo *B. glabrata* apresentou elevada taxa de suscetibilidade (92,10%), sendo que dos 48 espécimes infectados, 38 sobreviveram ao teste de infecção.

Tabela 4: Número de descendentes positivos para o teste de infecção de espécimes de *Biomphalaria tenagophila* coletados no córrego Herivelto Martins, Bananal-SP, após 64 meses da introdução da linhagem do Taim-RS.

Teste de Infecção	Grupos	Nº de espécimes infectadas	Nº de sobreviventes	Sobreviventes Positivos	Valor de p
2º Teste	Antes da Introdução (controle)	93	47	32 (68,08%)	0.0115*
	Pós Introdução (64 meses)	48	37	15 (40,54%)	
	<i>B. glabrata</i>	48	38	35 (92,10)	

* Diferença significativa entre espécimes coletadas antes e após 48 e 64 meses da introdução da linhagem do Taim ($p < 0,05$). Teste do Qui-quadrado apropriado para proporções (variável categ. nominal)

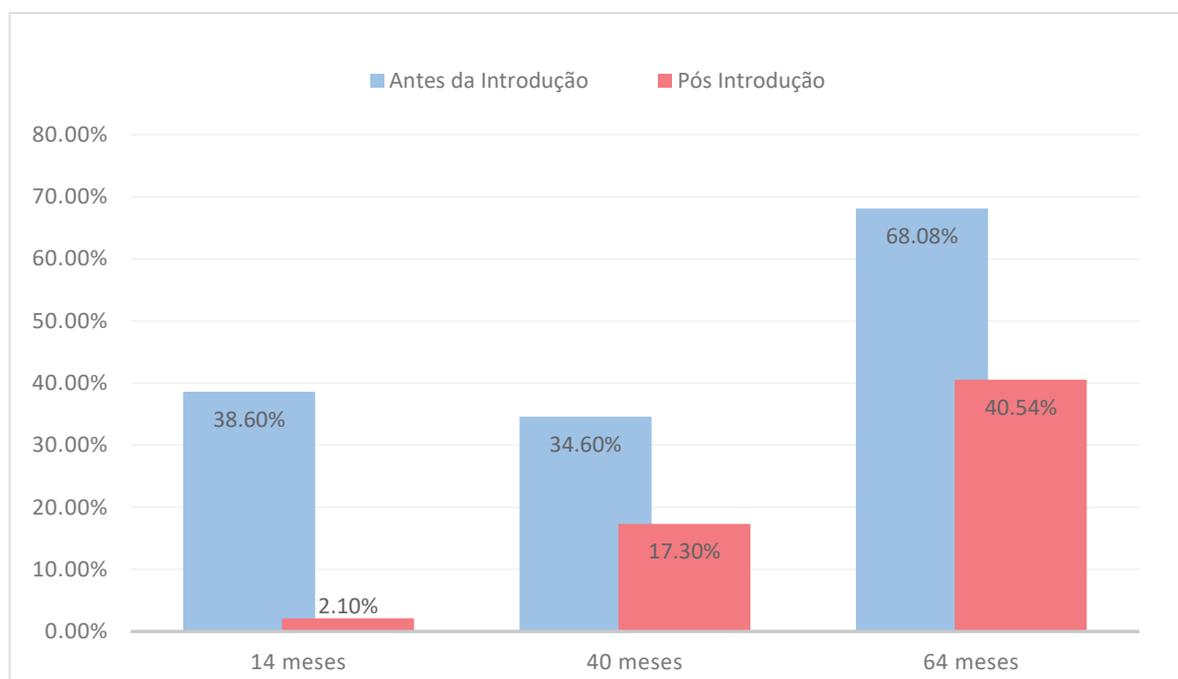


Figura 13: Gráfico com análise comparativa entre os testes de infecção realizados após 14 meses de introdução, por Marques et al. (2014), e os testes de 40 e 64 meses após a introdução da linhagem resistente de *Biomphalaria tenagophila* (d'Orbigny, 1835) do Taim no Córrego Herivelto Martins, Bananal-SP.

5.3- Análise Molecular

Devido ao baixo número de espécimes coletados e sua mortalidade em condições laboratoriais, a identificação do marcador de 350 pb foi realizada apenas nos moluscos submetidos aos testes de infecção, exceto nas amostras coletadas após 52 meses.

5.3.1- Amostras de 2013

Dos 49 moluscos sobreviventes ao exame parasitológico, apenas 26 tiveram êxito na extração de DNA, bem como na amplificação do fragmento de 1300 pb e sua posterior digestão pela enzima de Restrição *DdeI*.

Entre essas amostras, 19 foram negativas e sete positivas no exame parasitológico. Entre as negativas, sete amostras apresentaram o fragmento do Taim, ou seja 20,59% dessa população amostral. Entre as 12 amostras positivas, todas apresentaram o perfil de *B. tenagophila*, evidenciando os fragmentos de 800 e 470 pb, além dos fragmentos típicos de cercaria de *S. mansoni* com 600, 300 e 100 pb (Figura 14).

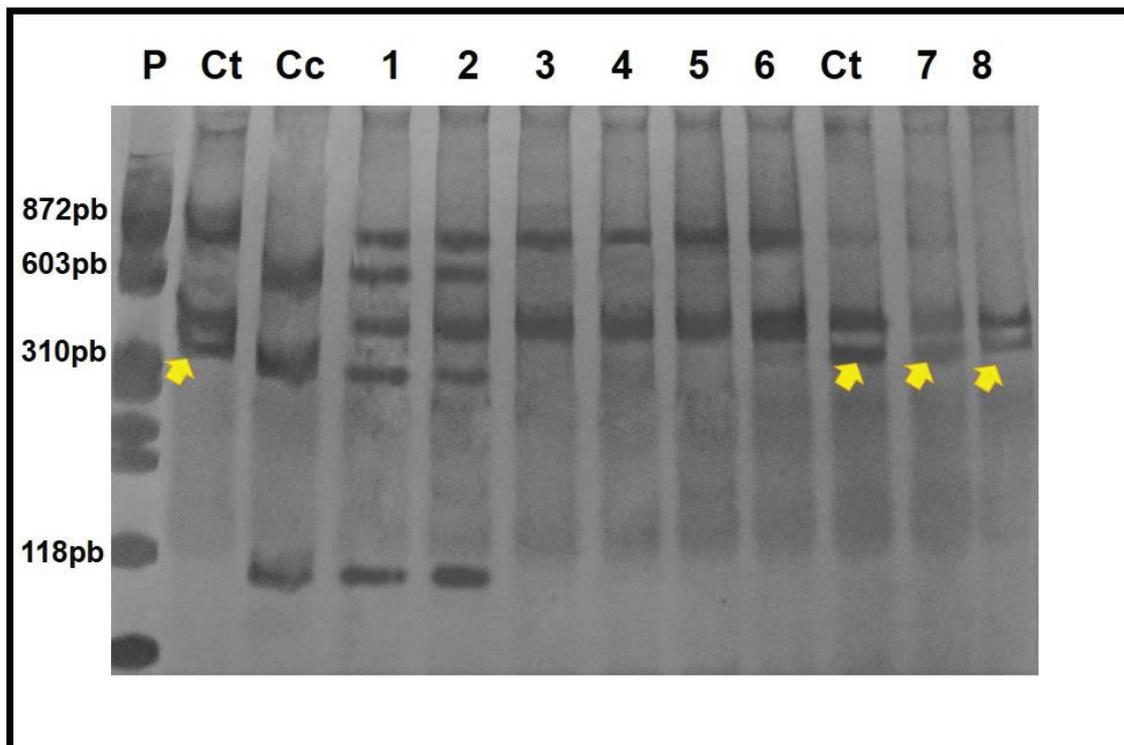


Figura 14: Gel de Poliacrilamida 6% corado por nitrato de prata a 10%, após as técnicas PCR-RFLP, mostrando as amostras com os seguintes fragmentos: Na canaleta “P” o

Padrão de Peso Molecular Phix 174 Hae III. Nas canaletas “Ct” o controle *B. tenagophila* da linhagem do Taim evidenciando, com a seta, o fragmento de 350 pb. Na canaleta “Cc” o *pool* de cercárias de *S. mansoni* como controle dos fragmentos típicos do parasito (aproximadamente 600, 310 e 100 pb). Canaletas 1 e 2, espécimes de *B. tenagophila* positivas para a infecção com *S. mansoni*. Nas canaletas 3 a 6, fragmentos de *B. tenagophila* negativas. Nas canaletas 7 e 8, fragmentos de *B. tenagophila* negativas, evidenciando com as setas o marcador de 350 pb.

5.3.2- Amostras de 2014

Embora não tenha sido possível analisar o fragmento de 350 pb nos espécimes submetidos ao teste de infecção, essa foi realizada diretamente nos moluscos provenientes do campo. Das 30 amostras analisadas, 29 tiveram o produto de 1300 pb amplificados, bem como os fragmentos obtidos pela digestão com a enzima *DdeI*. Todos os espécimes apresentaram o perfil de *B. tenagophila* com 800 e 470 pb. Nenhuma amostra apresentou o marcador do Taim de 350 pb (Figura 15).

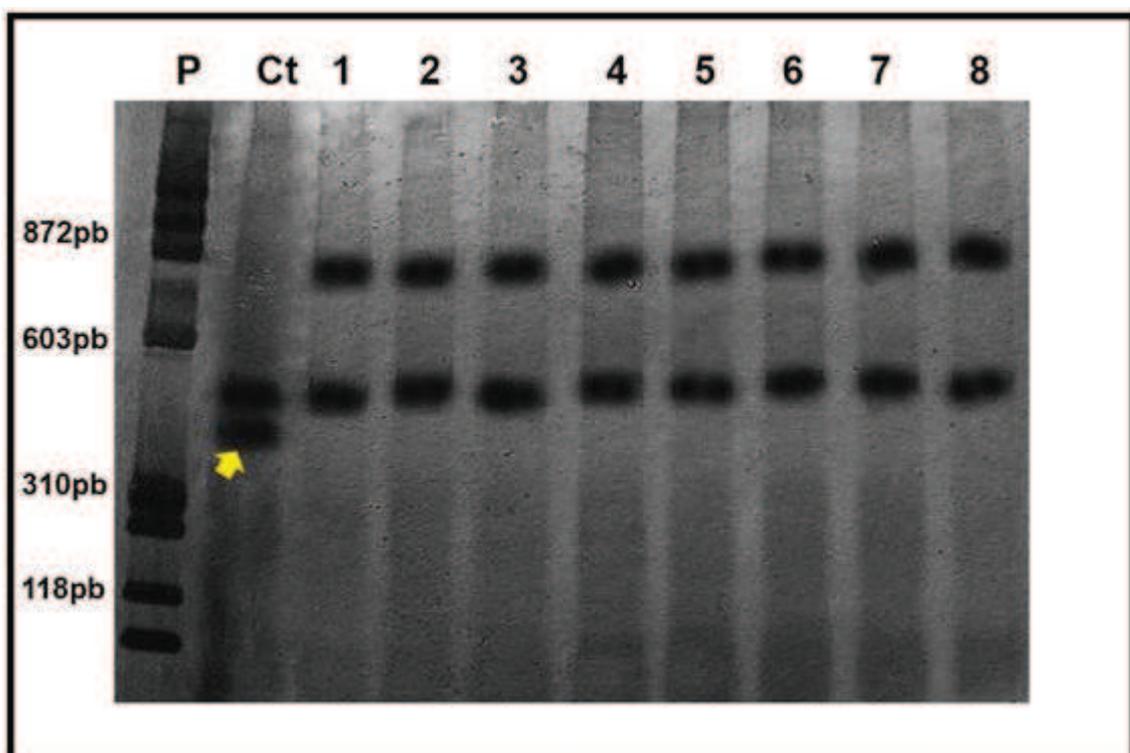


Figura 15: Gel de Poliacrilamida 6% corado por nitrato de prata a 10%, após as técnicas PCR-RFLP, mostrando os fragmentos de *B. tenagophila* de 800 e 470 pb (canaletas 1 a

8). Na canaleta “P” o Padrão de Peso Molecular Phix 174 Hae III e na canaleta “Ct” o controle com a linhagem do Taim e os fragmentos de 470 e 350 pb.

5.3.3- Amostras de 2015

Dos 37 espécimes sobreviventes ao teste de infecção, 17 tiveram o DNA extraído, o produto de 1300 pb amplificados e os fragmentos específicos obtidos pela digestão com a enzima de restrição *DdeI*. O grupo amostral foi composto por 11 amostras positivas e seis negativas.

Entre as 11 amostras positivas, nenhuma apresentou o marcador do Taim, porém, todas apresentaram o perfil de *B. tenagophila* com 800 e 470 pb associado aos fragmentos de cercárias de *S. mansoni* (600, 300 e 100 pb). Entretanto, nas seis amostras negativas, duas apresentaram o marcador de 350 pb do Taim, sendo 11,76% das amostras do grupo amostral. As quatro amostras restantes apresentaram o perfil típico de *B. tenagophila* com 800 e 470 pb (Figura 16). Esses resultados mostram que o patrimônio genético do Taim permanece na população de Bananal do córrego Herivelto Martins, ainda que de forma reduzida.

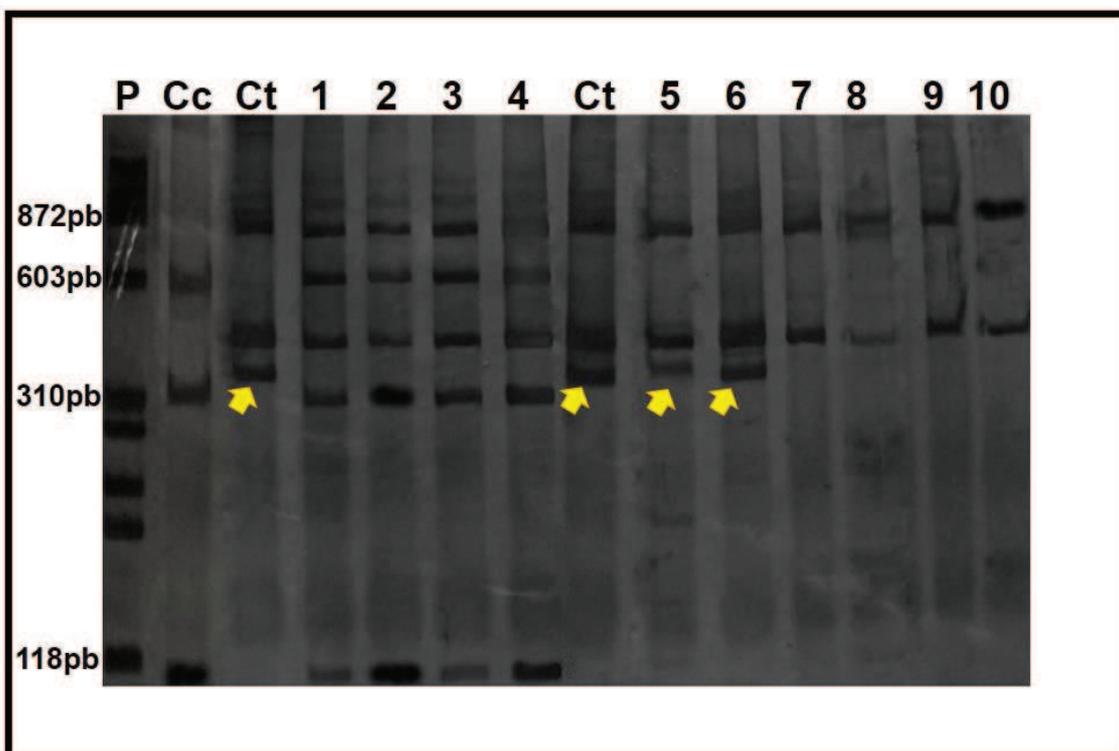


Figura 16: Gel de Poliacrilamida 6% corado por nitrato de prata a 10%, após as técnicas PCR-RFLP, mostrando os seguintes fragmentos: Na canaleta “P” o Padrão de Peso

Molecular Phix 174 Hae III (P). Na canaleta “Cc” o *pool* de cercárias de *S. mansoni* como controle dos fragmentos típicos do parasito (aproximadamente 600, 310 e 100 pb). Nas canaletas “Ct”, o controle *B. tenagophila* da linhagem do Taim evidenciando com as setas os fragmentos de 350 pb. Nas canaletas de 1 a 4, espécimes de *B. tenagophila* positivas para o teste de infecção com *S. mansoni*. Nas canaletas 05 e 06 fragmentos de *B. tenagophila* negativas para o teste de infecção, evidenciando, com setas, os fragmentos de 350 pb. Nas últimas quatro canaletas (amostras 7 a 10), fragmentos de *B. tenagophila* negativas.

5.4- Dados pluviométricos

Ao analisar os dados pluviométricos do município de Bananal, referentes ao período de 2010 a 2015, foi observado que no ano da introdução da linhagem resistente, a média de precipitação foi de 134,53 mm. Durante os três anos seguintes, não ocorreram grandes alterações nas médias anuais. No entanto, em 2014 tal registro foi de 56,09 mm, sendo, inclusive, as médias dos períodos de primavera e verão menores que a dos anos anteriores com uma estiagem anormal no período de inverno (Figura 17). Além disso, a última coleta realizada em 2015 (64 meses) ocorreu no início de novembro, após um mês sem registro de chuvas, um inverno marcado por baixa precipitação, com média de 15,37 mm e um outono sem registro de precipitação por dois meses consecutivos.

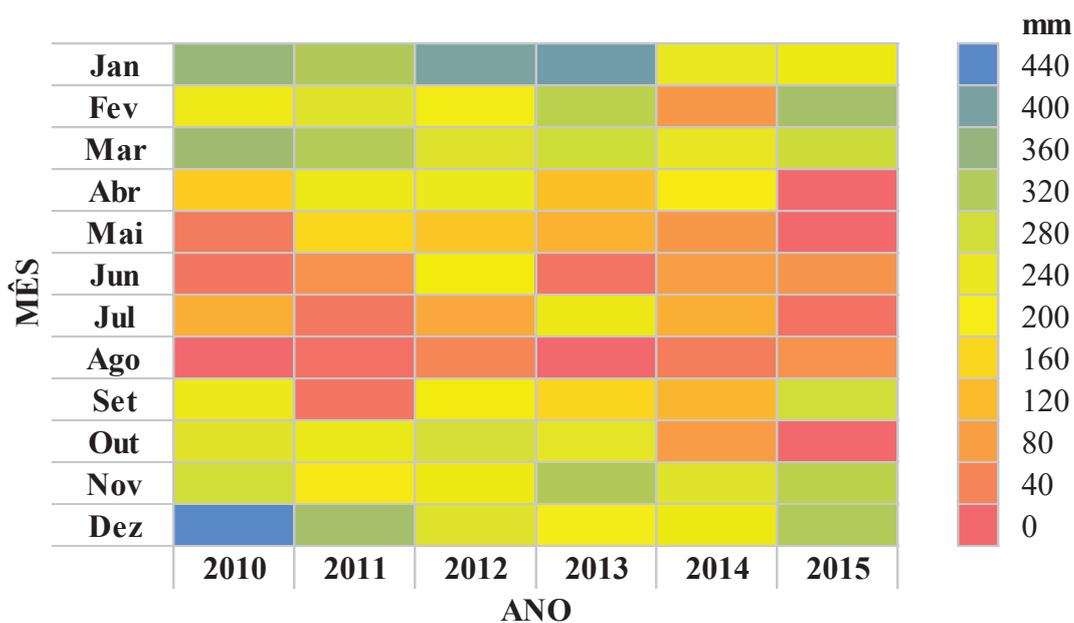


Figura 17: Precipitação no Município de Bananal-SP entre os anos de 2010 e 2015.

Fonte: DAA/SP.

6- DISCUSSÃO

Os resultados obtidos após a introdução da linhagem resistente no córrego Herivelto Martins, em julho de 2010, foram promissores. Dessa forma, era esperado que os níveis de suscetibilidade permanecessem reduzidos e a presença do marcador de 350 pb permanecesse elevado, visto que o caráter resistência e o marcador são dominantes e transmitidos aos seus descendentes (ROSA et al., 2004; ROSA et al., 2005; ROSA et al., 2006). No entanto, os resultados obtidos durante o período de 2013 a 2015 indicaram que ocorreu o aumento da suscetibilidade e a diminuição do marcador de 350 pb na população de *B. tenagophila* do córrego Herivelto Martins, quando comparado com os dados obtidos por Marques et al. (2014).

Como os dados de suscetibilidade dos descendentes dos moluscos coletados em 2013 (40 meses pós introdução) aumentou para 17,3%, houve a necessidade de explorar novamente a área de introdução para verificar a existência de possíveis afluentes interferindo na dinâmica populacional dos moluscos do córrego Herivelto Martins.

Durante a coleta de 2014, foi observado que a introdução realizada em 2010, considerada até o presente momento como ocorrida na nascente, foi interpretada de forma errônea. Essa nova observação foi comprovada ao explorar a região até então coberta por vegetação, o que possibilitou demarcar a verdadeira nascente que estava localizada alguns metros acima do local definido como sítio de introdução (22°43'48.171" S e 44°21'31.885"W). Além dessa nascente, foi descoberta uma área úmida que também deságua no ambiente lântico do córrego, abaixo do local onde ocorreu a introdução. A descoberta dessas duas nascentes gerou a hipótese de que outros espécimes, que não haviam mantido contato com a linhagem do Taim, poderiam estar colonizando o córrego e, assim, interferindo no aumento da suscetibilidade da população local. Posteriormente, foram realizados testes de infecção com os espécimes coletados nas nascentes e os resultados indicaram que esses também são suscetíveis ao *S. mansoni*.

Conforme mencionado anteriormente, não foi possível analisar a suscetibilidade dos descendentes de moluscos coletados em 2014 (52 meses pós introdução), devido a mortalidade desse grupo. Em relação aos dados obtidos com os descendentes dos moluscos coletados em 2015 (64 meses pós introdução), foi mostrada a ocorrência do aumento das taxas de infecção (40,54%), quando comparado com períodos anteriores. Entretanto, o seu grupo controle também apresentou valores bem acima do esperado (68,08%).

Ao analisar a presença do marcador de 350 pb nas amostras positivas e negativas referentes ao período de 2013 (40 meses pós introdução), foi observado que 20,59% dos moluscos apresentavam o marcador, sendo que todos eram negativos para a infecção. Nenhuma das amostras coletadas em 2014 apresentaram o fragmento de 350 pb. Por outro lado, o marcador reaparece nas amostras referentes a 2015 (64 meses pós introdução), embora em baixas proporções (11,76%) e apenas em indivíduos negativos ao teste de infecção. O fato do marcador ser encontrado justamente em moluscos resistentes (moluscos que não eliminaram cercárias) pode indicar associação do mesmo com o(s) gene(s) da resistência na transmissão aos seus descendentes, considerando que ambos possuem caráter dominante (MARQUES et al., 2014).

Os dados moleculares e de suscetibilidade obtidos neste presente trabalho são de suma importância para a compreensão do que ocorreu com a população de *B. tenagophila* do córrego Herivelto Martins, após vários anos da introdução da linhagem resistente. Conforme mencionado, um dos fatores que pode interferir no modelo proposto, foi o fato da introdução não ter sido realizada na nascente do córrego o que provavelmente acarretou na presença de moluscos suscetíveis de outros locais.

Outro fator que pode ter influenciado nos resultados, foi a redução do volume de água ao longo do curso do córrego Herivelto Martins, principalmente nos anos de 2014 e 2015. O clima de Bananal é tropical, porém mais controlado pelo tropical de altitude, devido à proximidade da serra da Bocaina (altitude 1180 metros). A presença desse relevo torna a precipitação do município bastante elevada, com as médias da estação de verão chegando a 200 mm (GUTJAHR et al., 2012). O fato da pluviosidade média de verão em 2014 e 2015 ter sido bem abaixo do esperado, pode ter influenciado nas últimas coletas, bem como na população dos moluscos. Estudos mostram que os fatores hidrológicos influenciam diretamente a dinâmica populacional de *Biomphalaria* spp. (GIOVANELLI et al., 2005; OHWEILER & KAWANO 2002; PALASIO et al., 2015). Segundos tais estudos, variações pluviométricas, gerando um quadro extremo entre secas e/ou cheias, afetam a densidade populacional dos moluscos, causando dispersão, morte ou dessecação. Esses fatores podem ter contribuído para que o patrimônio genético do Taim não fosse mantido de forma tão eficiente na população local.

Mesmo com esses fatores o estudo mostra que esse novo modelo de controle da esquistossomose é eficaz. Essa afirmativa é justificada principalmente pela presença do marcador que persiste na população após cinco anos da introdução da linhagem resistente. Além disso este está presente exatamente nas amostras negativas, indicando a possível relação entre a dispersão do marcador e a resistência à infecção por *S. mansoni*.

7- PERSPECTIVAS

Os dados de suscetibilidade obtidos neste presente trabalho indicaram que *B. tenagophila* do córrego Herivelto Martins, após a introdução da linhagem do Taim, sofreu alterações. Apesar do aumento da suscetibilidade e das alterações abióticas, após os cinco anos de monitoramento, a presença do marcador de 350pb persistiu na população, ainda que em baixa proporção, indicando a eficácia do modelo proposto.

A realização de novas introduções da linhagem do Taim pode ser uma alternativa de garantir a manutenção do seu patrimônio genético por um período maior de tempo frente a possíveis alterações na temperatura e/ou pluviosidade, que possam alterar a coleção hídrica, além da dispersão dos espécimes introduzidos para afluentes onde o local de estudo tenha sua foz. Essa hipótese surgiu com uma nova introdução de 2.500 espécimes dessa linhagem, em julho de 2016, onde estes foram distribuídos ao longo do córrego Herivelto Martins e na nascente da área úmida que deságua no local de estudo.

Os resultados preliminares mostraram a presença do marcador molecular de 350 pb em 58,33% dos descendentes dos moluscos, coletados após quatro meses dessa nova introdução e o seu impacto sobre a suscetibilidade da população local de *B. tenagophila* ainda está sendo avaliado.

8- CONCLUSÃO

- O aumento da suscetibilidade e a redução do marcador molecular na população do córrego Herivelto Martins, após a introdução da linhagem do Taim indicaram a interferência de fatores externos do local de estudo;
- A redução da coleção hídrica, impactada pela baixa pluviosidade local, contribuiu de forma negativa para a transmissão do patrimônio genético do Taim na população local;
- A presença do marcador de 350pb na população, após cinco anos da introdução da linhagem resistente, indica que o modelo proposto apresenta resultados positivos como estratégia de controle da esquistossomose;
- Estudos prévios mostram que uma alternativa para aumentar o sucesso da intervenção é a realização de novas introduções na área de estudo.

9- REFERÊNCIAS

- ADEMA, C.M.; et al.: **Whole genome analysis of a schistosomiasis-transmitting freshwater snail.** *Nature*, 8: 15451, 2017.
- AMARAL, R.S.; et al.: **An analysis of the Impact of the Schistosomiasis Control Programme in Brazil.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 10(Suppl. I): 79-85, 2006.
- ANDRADE, R.M.: **Controle biológico de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) Através de *Tilapia nilótica* (Hasselquist, 1757), em laboratório (Pulmonata, Planorbidae, Pisces Cichilidae).** *Ver. Soc. Bras. Med. Trop*, 15: 39-52, 1979.
- BARBOSA, F.S. & OLIVIER, L.: **Studies on the snail vectors of bilharziasis mansoni in north-eastern Brazil.** *Bull. of the World Health Organ*, 18: 895-908, 1958.
- BARBOSA, C.S.; BARBOSA, F.S. & ARRUDA, F.: **Long-Term Controlled Field Experiment on the Competition Between Two Species of *Biomphalaria* (Mollusca, Basommatophora), the Snail Vectors of *Schistosoma mansoni* in Northeastern Brazil.** *Cad. Saúde Públ.*, 9(2): 170-176, 1993.
- BARBOSA, L.; et al.: **Resistance to *Schistosoma mansoni* by transplantation of APO *Biomphalaria tenagophila*.** *Parasite Immunology*, 28(5): 209-12, 2006.
- BEZERRA, F.S.M.; et al. **Quantification of the population and Phagocytary activity of Hemocytes of Resistant and Susceptible strais of *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria tenagophila* infected with *Schistosoma mansoni*.** *Rev. Ins. Med Trop São Paulo*, 39(4): 197-201, 1997.
- BEZERRA, F.S.M.; et al.: **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(1): 73-5, 2003.
- BISOFFI, Z.; BUONFRATE, D. & BELTRAME, A.: **Schistosomiasis transmission in Europe.** *Lancet Infect Dis*, May 16, 2016.

BOISSIER, J.; et al.: **Schistosomiasis Reaches Europe**. The Lancet, 15: 757-758, 2015.

BRASIL, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2016. Disponível em: <<http://cod.ibge.gov.br/2VTAA>>, acesso em 18 de setembro de 2017.

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). 2ª. ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde. 178p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos), 2008.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica (b).: **Pirajá da Silva**: O incontestável descobridor do *Schistosoma mansoni*. Brasília, Editora do Ministério da Saúde, 2008.

CALDEIRA, R.L.; et al.: **Preliminary studies investigating the occurrence of *Biomphalaria cousini* in Brazil**. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 105(4): 485-87, 2010.

CALDEIRA, R. L.; et al.: **Characterization of South American Snails of the Genus *Biomphalaria* (Basommatophora: Planorbidae) and *Schistosoma mansoni* (Platyhelminthes: Trematoda) in Molluscs by PCR-RFLP**. BioMed Research International, 2016: 1-5, 2016.

CAMARGO, E.A.F.; et al.: **Assessment of the impact of changes in temperature in *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) melanica and albino variants infected with *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907)**. Braz. J. Biol., 77(3): 490-494, 2017.

CARVALHO, O.; SOUZA, C.P. & KATZ, N.: **Primeiro encontro de *Biomphalaria tenagophila* (D'Orbigny, 1835) naturalmente infectada com *Schistosoma mansoni* em Itajubá, sul do Estado de Minas Gerais, Brasil**. Rev. Saude Públ., 19(1): 88-91, 1985.

CARVALHO, O.S.; et al: **Distribuição Espacial de *Biomphalaria glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila*, Hospedeiros Intermediários de *Schistosoma mansoni* no Brasil**. In: CARVALHO, O.S.; COELHO, P.M.Z. & LENZI, H.L.; (Org.).

***Schistosoma mansoni* & Esquistossomose: uma visão multidisciplinar.** Rio de Janeiro: Fiocruz; p. 393-418, 2008.

CARVALHO, O.S.; et al: **The Estrada Real project and endemic disease: the case of schistosomiasis, geoprocessing and tourism.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 105(4): 532-36, 2010.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/dpdx/schistosomiasis/index.html>>, acesso em 20 de dezembro de 2017.

CHIEFFI, P.P.: **Helminthiasis and environmental and climatic changes.** Arq Med Hosp. Fac. Cienc. Med. Santa Casa, 60:27-31, 2015.

COELHO, M.V.: **Aspectos do desenvolvimento de formas larvais de *Schistosoma mansoni* em *Australorbis nigricans*.** Rev. Bras. de Biol., 17: 235-37, 1957.

COELHO, P.M.Z.; et al: ***Biomphalaria tenagophila/Schistosoma mansoni* Interaction: Premises for a New Approach to Biological Control of Schistosomiasis.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 99(suppl. 1): 109-111, 2004.

COELHO, J.R. & BEZERRA, F.S.M.: **Compatibility of *Biomphalaria tenagophila* with *Schistosoma mansoni*: a study of homologous plasma transference.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 101(1): 111-2, 2006.

COELHO, P.M.Z.; et al: **Transmission control of schistosomiasis mansoni by introduction of a resistant strain of *Biomphalaria tenagophila* in areas where transmission is maintained by this species.** Acta Tropica, 108: 245-48, 2008.

COELHO, P.M.Z.; et al (b): **Evolução de *Schistosoma mansoni* no hospedeiro intermediário.** In: CARVALHO, O.S.; COELHO, P.M.Z. & LENZI, H.L.; (Org.). ***Schistosoma mansoni* & Esquistossomose: uma visão multidisciplinar.** Rio de Janeiro: Fiocruz; p. 149-60, 2008.

- COELHO, P.M.Z. & CALDEIRA, R.L.: **Critical Analysis off Molluscicide application in schistosomiasis control programs in Brazil**. *Infectious Diseases of Poverty*, 5(57): 1-6, 2016.
- COLLEY, D.G.; et al.: **Human Schistosomiasis**. *Lancet*, 383(9936): 2253-64, 2014.
- CORRÊA, M.C.R.; COELHO, P.M.Z. & FREITAS, J.R.: **Susceptibilidade de Linhagens de *Biomphalaria tenagophila* e *B. glabrata* a duas Cepas do *Shistosoma mansoni* (LE- Belo Horizonte, MG E SJ- São José Dos Campos, SP)**. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 21: 72-76, 1979.
- DAA/SP: ESTADO DE SÃO PAULO, Departamento de Águas e Energia Elétrica, Banco de dados Hidrológicos, Governo do Estado de São Paulo: CTH; 2011. Disponível em: <<http://www.hidrologia.dae.sp.gov.br/>> , acesso em 19 de setembro de 2017.
- DEJONG, R.J.; EMERY, A.M. & ADEMA, C.: **The mitochondrial genome of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda: Basommatophora), intermediate host of *Schistosoma mansoni***. *J. Parasitol.*, 90(5): 991-97, 2004.
- FENWICK, A.; ROLLINSON, D. & SOUTHGATE, V.: **Implementation of Human Schistosomiasis Control: Challenges and Prospects**. *Advances in Parasitology*, 61: 567-622, 2006.
- FREITAS, J.R.; BOSCHI, M.B. & SANTOS, M.B.L.: **Suscetibilidade de “híbridos” de *Biomphalaria tenagophila* à Cepa LE (BH) do *Schistosoma mansoni***. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 27(1): 6-12, 1985.
- FREITAS, J.R.: **Ritmo de crescimento da *Biomphalaria glabrata* (Say,1818), padronização da técnica de criação** [Tese]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 1973.
- GIOVANELLI, A.; et al.: **Habitat preference of freshwater snails in relation to environmental factors and the presence of the competitor snail *Melanooides tuberculatus* (Müller, 1774)**. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 100(2):169–176, 2005.

GOLVEIA, C.O.: **Sequenciamento parcial do DNA mitocondrial de *Biomphalaria straminea* e análise comparativa com *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria tenagophila***. [Dissertação] Belo Horizonte: Centro de Pesquisas René Rachou; 2010.

GRYSSELS, B.; et al.: **Human Schistosomiasis**. *Lancet*, 368: 1106-18, 2006.

GUIMARÃES, C.T.; et al.: **Controle Biológico: *Helobdella triserialis lineata* Blanchard, 1849 (Hirudinea: Glossiphonidae) sobre *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Mollusca: Planorbidae) em laboratório**. *Rev. Saúde Publ.*, 17: 481-92, 1983.

GUIMARAES, R.J.P.S.; et al.: **A geoprocessing approach for studying and controlling schistosomiasis in the state of Minas Gerais, Brazil**. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 105(4): 524-31, 2010.

GUTJAHR, M.R.; TAVARES, R. & SILVA, M.: **Fatores Climáticos Determinantes na Estação Ecológica de Bananal – SP**. *Rev. Geonorte*, 2(5): 1076-88, 2012.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE (IPCC, 2012): **Summary for Policymakers**. In: FIELD, C.B.; V. BARROS, T.F.; STOCKER, D.; QIN, D.J.; DOKKEN, K.L.; EBI, M.D.; MASTRANDREA, K.J.; MACH, G.-K.; PLATTNER, S.K.; ALLEN, M.; TIGNOR,; MIDGLEY, P.M. (Org.): **Managing the Risks of Extreme Events and Disasters to Advance Climate Change Adaptation: A Special Report of Working Groups I and II of the Intergovernmental Panel on Climate Change**. Cambridge, UK, and New York, USA, Cambridge University Press, 3-21, 2012.

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

JANNOTTI-PASSOS, L.K.; et al.: **Phylogenetic analysis of *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835) (Mollusca: Gastropoda)**. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 105(4): 504-11, 2010.

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; 63: 153-56, 1994.
- LAFFERTY, K.D.: **The Ecology of Climate change and Infectious diseases.** Ecology, 90(4): 888-900, 2009.
- LARDANS, V. & DISSOUS, C.: **Snail Control Strategies for Reduction of Schistosomiasis Transmission.** Parasitology Today, 14(10) 413-18, 1998.
- LENZI, H.L.; et al.: **Migração e Desenvolvimento de *Schistosoma mansoni* no Hospedeiro Definitivo.** In: CARVALHO, O.S.; COELHO, P.M.Z. & LENZI, H.L.; (Org.). *Schistosoma mansoni* & Esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Fiocruz; p,87-146, 2008.
- LIANG, Q.; et al.: **A rapid and effective method for silver staining of PCR products separated in polyacrylamide gels.** Electrophoresis, 35(17): 2520-23, 2014.
- MARQUES, D.P.A.: **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*.** [Dissertação] Belo Horizonte: Centro de Pesquisas René Rachou; 2012.
- MARQUES, D.P.A.; et al.: **Reduced susceptibility of a *Biomphalaria tenagophila* population to *Schistosoma mansoni* after introducing the resistant Taim/RS strain of *B. tenagophila* into Herivelton Martins stream.** PLoS ONE, 9(6): 1-5, 2014.
- MARTINS-SOUZA, R.L.; et al.: **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.** Parasitology Research, 91(6): 500-07, 2003.
- MARTINS-SOUZA, R.L.; et al.: **Differential lectin labelling of circulating hemocytes from *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria tenagophila* resistant or susceptible to *Schistosoma mansoni* infection.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 101(Suppl.

1): 185-192, 2006.

MARTINS-SOUZA, R.L.; et al.: **Flow cytometry analysis of the circulating haemocytes from *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria tenagophila* following *Schistosoma mansoni* infection.** Parasitology, 136: 67–76, 2009.

MARTINS-SOUZA, R.L.; et al.: **Participation of N-acetyl-D glucosamine carbohydrate moieties in the recognition of *Schistosoma mansoni* sporocysts by haemocytes of *Biomphalaria tenagophila*.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 106(7): 884-91, 2011.

MATTOS, A.C.A.; et al.: **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, 106(4): 424-32, 2011.

MCCREESH, N. & BOOTH, M.: **The Effect of Increasing Water Temperatures on *Schistosoma mansoni* Transmission and *Biomphalaria pfeifferi* Population Dynamics: An Agent-Based Modelling Study.** PlosOne, 9(7): e101462, 2014.

MELO, A.L. & PEREIRA, L.H.: **On the finding of *Biomphalaria tenagophila* naturally infected with *Schistosoma mansoni* in the State of Minas Gerais, Brazil.** Rev Inst Med Trop São Paulo, 27(2): 99-101, 1985.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/esquistossomose/situacao-epidemiologica>>, acesso em 17 de dezembro de 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/png/2017/setembro/14/mapa-distribuicao-esquistossomose-2010-1015.png>>, acesso em 18 de dezembro de 2017.

NACIF-PIMENTA, R.; et al.: ***Schistosoma mansoni* in Susceptible and Resistant Snail Strains *Biomphalaria tenagophila*: In Vivo Tissue Response and In Vitro Hemocyte Interactions.** PLoS ONE, 7(9): 1-12, 2012.

NEGRÃO-CORREA, D.; et al.: **Interaction of *Schistosoma mansoni* sporocysts and**

- hemocytes of *Biomphalaria***. Journal of Parasitology Research, 2012: 1-6, 2012.
- OHLWEILER, F.P. & KAWANO, T.: ***Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835) (Mollusca):** Adaptation to desiccation and susceptibility to infection with *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907. Rev. Inst. Med. Trop., 44(4): 191-201, 2002.
- ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE: **Mudança Climática e Saúde: Um perfil do Brasil**, Brasília-DF, Ministério da Saúde, 2009.
- PALASIO, R.G.S.; et al.: **The current distribution pattern of *Biomphalaria tenagophila* and *Biomphalaria straminea* in the northern and southern regions of the coastal fluvial plain in the state of São Paulo**. Biota Neotropica, 15(3): 1-6, 2015.
- PARAENSE, W.L.: **Autofecundação e Fecundação Cruzada em *Australorbis glabratus***. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 53: 2-4, 1955.
- PARAENSE, W.L. & DESLANDES, N.: **Observations on the morphology of *Australorbis glabratus***. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 53(1): 87-103, 1955.
- PARAENSE, W.L.: **Apertural lamellae in *Australorbis glabratus***. Proceedings of the Malacological Society of London, 32: 175-79, 1957.
- PARAENSE, W.L.: **Planorbídeos hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni***. In CUNHA, A.S. (Org.): **Esquistossomose mansonica**. São Paulo, Savier/Edusp, p.13-30, 1970.
- PARAENSE, W.L.: **Fauna planorbídica do Brasil**. In: LACAZ, C.S.; BARUZZI, G.R. & SIQUEIRA, J.R.W.; (Org.): **Introdução à geografia médica do Brasil**. São Paulo, Ed. Universidade de São Paulo, p. 213-39, 1972.
- PARAENSE, W.L. & CORREA, L.R.: **Susceptibility of *Biomphalaria peregrina* from Brazil and Ecuador to two strains of *Schistosoma mansoni***. Rev. Inst. Med. Trop. 15(3): 127-30, 1973.

PARAENSE, W.L.: **A natural population of *Heliosoma duryi* in Brazil.** Malacol. 15 (2): 369-76, 1976.

PARAENSE, W.L. & CORREA, L.R.: **Differential susceptibility of *Biomphalaria tenagophila* populations to infection with a strain of *Schistosoma mansoni*.** J. Parasitol., 64(5): 822-26, 1978.

PARAENSE, W.L.: **Distribuição dos moluscos no Brasil.** In: REIS, E.A.; FARIA, I. & KATZ, N.; (Org.): **Modernos conhecimentos sobre Esquistossomose Mansônica.** Belo Horizonte: Academia Mineira de Medicina; p. 51-66, 1986.

PARAENSE, W.L.: **The schistosome vectors in the Americas.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 96(Suppl. 1): 7-16, 2001.

PARAENSE, W.L.: **Histórico do Gênero *Biomphalaria*, Morfologia e Sistemática Morfológica.** In: CARVALHO, O.S.; COELHO, P.M.Z. & LENZI, H.L.; (Org.): ***Schistosoma mansoni* & Esquistossomose: uma visão multidisciplinar.** Rio de Janeiro: Fiocruz; p. 285-308, 2008

PELLEGRINO, J. & KATZ, N.: **Experimental chemotherapy of Schistosomiasis mansoni.** Adv. Parasitol. , 6: 233-90, 1968.

PEREIRA, C.A.J.; et al.: **Participation of cell-free haemolymph of *Biomphalaria tenagophila* in the defence mechanism against *Schistosoma mansoni* sporocysts.** Parasite Immunology, 30: 610-19, 2008.

PIERI, O.S.: **Perspectivas no controle ambiental dos moluscos vetores da esquistossomose.** In: BARBOSA, F.S., (Org.): **Tópicos em Malacologia Médica.** Rio de Janeiro: Fiocruz; p. 239-52, 1995.

POINTIER, J.P. & MCCULLOUGH, F.: **Biological Control of the snail hosts of *Schistosoma mansoni* in the Caribbean area using *Thiara* spp.** Acta tropica, 46: 147-55, 1989.

POINTIER, J.P.: **The Introduction of *Melanoides tuberculata* (Mollusca: Thiaridae) to the island of Santa Lucia (West Indies) and its role in the decline of *Biomphalaria glabrata*, the snail intermediate host of *Schistosoma mansoni*.** Acta tropica, 54: 13-8, 1993.

ROSA, F.M.; et al.: **Dominant character of the molecular marker of a *Biomphalaria tenagophila* strain (Mollusca: Planorbidae) resistant to *Schistosoma mansoni*.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 99(1): 85-7, 2004.

ROSA, F.M.; et al.: ***Biomphalaria tenagophila*: Dominant character of the resistance to *Schistosoma mansoni* in descendants of crossbreedings between resistant (Taim, RS) and susceptible (Joinville, SC) strains.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 100(1): 19-23, 2005.

ROSA, F.M.; et al.: ***Biomphalaria tenagophila*: Dynamics of Populations of Resistant and Susceptible Strains to *Schistosoma mansoni*, with or without pressure of the Parasite.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 101(Suppl. 1): 247-51, 2006.

ROSA, F.M.; et al.: **Breeding of *Biomphalaria tenagophila* in Mass Scale.** Rev. Inst. Med. Trop., 55(1): 39-44, 2013.

ROSENTHAL, J.: **Climate Change and the Geographic Distribution of Infectious Diseases.** EcoHealth, 6: 489-95, 2009.

SANGUINETTI, J.C.; DIAS-NETO, E. & SIMPSON, A.J.G.: **Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels.** Bio Techniques, 5: 915-18, 1994.

SANTOS, M.B.L.; et al.: **Suscetibilidade ao *Schistosoma mansoni* de híbridos de *Biomphalaria tenagophila* do Taim, RS, Cabo Frio, RJ, e Belo Horizonte.** Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 21(6): 281-86, 1979.

SARQUIS, O.; PIERI, O.S. & SANTOS, J.A.A.: **Effects of Bayluscide WP 70 on the Survival and Waterleaving Behaviour of *Biomphalaria straminea*, Snail Host of Schistosomiasis in Northeast Brazil.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 92(5): 619-23, 1997.

- SILVA, R.E.; MELO, A.L. & PEREIRA, L.H.: **Suscetibilidade de *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria glabrata* de uma mesma região a duas cepas de *Schistosoma mansoni***. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 36(5): 409-15, 1994.
- SILVA-NETO, A.; et al.: **Ultrastructural characterization of cells in primary cultures from different adult tissues of *Biomphalaria tenagophila* TAIM, a strain that is absolutely resistant to *Schistosoma mansoni* infection**. Micron, 67: 37-49, 2014.
- TELES, H.M.S. & MARQUES, C.C.A.: **Estivação de *Biomphalaria tenagophila* (Pulmonata, Planorbidae)**. Rev. Saúde públ., 23:76-8, 1989.
- TELES, H.M.S.: **Distribuição de *Biomphalaria tenagophila* e *B. occidentalis* no Estado de São Paulo (Brasil)**. Rev. Saúde Public., 23(3): 244-53, 1989.
- TELES, H.M.S.; et al. (a):**Schistosomiasis mansoni in Bananal (State of São Paulo, Brazil): II. Intermediate Hosts**. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 97(Suppl.I): 37-41, 2002.
- TELES, H.M.S.; et al. (b):**Schistosomiasis mansoni in Bananal (State of São Paulo, Brazil): I. Efficiency of diagnostic and treatment procedures**. Mem. Inst. Oswaldo Cruz; 97 (Suppl.I): 181-86, 2002.
- TELES, H.M.S.: **Geographic distribution of *Schistosoma mansoni* transmitter snail species in State of São Paulo**. Rev. Soc. Bras Med Trop., 38(5): 426-32, 2005.
- TELES, H.M.S & CARVALHO, O.S.: **Implicações da Biologia de *Biomphalaria* no Controle da Esquistossomose**. In: CARVALHO, O.S.; COELHO, P.M.Z. & LENZI, H.L.; (Org.). *Schistosoma mansoni* & Esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Fiocruz; p. 459-484, 2008.
- TEODORO, T.M. **Investigação da ocorrência de *Biomphalaria cousini* no Brasil e sua suscetibilidade ao *Schistosoma mansoni***. [Dissertação]. Belo Horizonte: Centro de Pesquisas René Rachou; 2009.

- TEODORO, T.M.; et al.: **Occurrence of *Biomphalaria cousini* (Mollusca: Gastropoda) in Brazil in its susceptibility to *Schistosoma mansoni* (Platyhelminths: Trematoda).** Mol. Phylogenet. Evol, 57(1): 144-51, 2010.
- THIENGO, S.C.; et al.: **Freshwater Snails and Schistosomiasis Mansoni in the State of Rio de Janeiro , Brazil: I - Metropolitan Mesoregion.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 96(Suppl): 177-84, 2001.
- THIENGO, S.C.; et al.: **Freshwater Snails and Schistosomiasis Mansoni in the State of Rio de Janeiro, Brazil: II - Centro Fluminense Mesoregion.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz; 97(5): 621-26, 2002.
- THIENGO, S.C.; et al.: **Freshwater Snails and Schistosomiasis Mansoni in the State of Rio de Janeiro, Brazil: IV – Sul Fluminense Mesoregion.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 99(3): 275-80, 2004.
- VIDIGAL, T.H.D.A.; et al.: ***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., 89 (2): 180-87, 1998.
- VIDIGAL, T.H.D.A.; et al.: **Further Studies on the Molecular Systematics of *Biomphalaria* Snails from Brazil.** Mem. do Inst. Oswaldo Cruz, 95(2): 57–66, 2000.
- WEINZETTL, M. & JURBERG, P.: **Biological Control of *Biomphalaria tengophila* (Mollusca, Planorbidae), a Schistosomiasis Vector, using the Fish *Geophagus brasiliensis* (Pisces, Cichlidae) in the Laboratory or in a Seminatural Environment.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 85(1): 35-8, 1990.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION: **Schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis: number of people treated in 2015.** Weekly Epidemiological Record, 91: 53-60, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Field use of Molluscicides in Schistosomiasis Control Programmes:** an operational manual for programme managers. France, WHO, 2017.

XIAO-NONG, Z.; et al.: **The public health significance and control of schistosomiasis in China - then and now.** Acta tropica, 96: 97-105, 2005.

ZHENG, J.; et al.: **Relationship between the transmission of Schistosomiasis japonica and the construction of the Three Gorge Reservoir.** Acta tropica, 82: 147-56, 2002.