



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL



Mestrado em Parasitologia Médica

VARIAÇÃO GENÉTICA DE DUAS ESTIRPES DE
***Biomphalaria glabrata* SAY, 1818 NOS PERÍODOS PRÉ E**
PÓS EXPOSIÇÃO A MIRACÍDIOS DE *Schistosoma mansoni*
SAMBON, 1907

LISA SILVA MARTINS

2010



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL



Variação Genética de Duas Estirpes de *Biomphalaria glabrata*
Say, 1818 nos Períodos Pré e Pós Exposição a Miracídios de
Schistosoma mansoni Sambon, 1907

LISA SILVA MARTINS

*Tese apresentada para obtenção de grau
de Mestre em Parasitologia Médica*

Orientadora: Prof^a Doutora Maria Amélia Afonso Grácio

Co-Orientadora: Prof^a Doutora Maria Manuela Calado

Apoio Financeiro

- Unidade de Parasitologia e Microbiologia Médicas do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (UPMM/IHMT) - Unidade de Financiamento plurianual da FCT.



- União Europeia Feder.

*“À beira de um precipício só há maneira de andar para a frente:
é dar um passo atrás.”
(M. Montaigne)*

Publicação apresentada no âmbito deste trabalho:

MARTINS, L., CALADO, M. & GRÁCIO, M. A. A, (2009). Diferenciação genética de três estirpes de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) no período após exposição a miracídios de *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907): resultados preliminares. *Acta Parasitológica Portuguesa*, **16**: 322-323.

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo.....	iv
<i>Abstract</i>	v
Índice de Figuras	vi
Índice de Tabelas	viii
Abreviaturas	ix

Capítulo I - Introdução

1.1 Breves referências históricas sobre os moluscos	2
1.2 Generalidades sobre a classe Gastropoda	3
1.3 Considerações gerais sobre <i>Biomphalaria glabrata</i>	4
1.3.1 Características morfológicas da espécie <i>B. glabrata</i>	4
1.3.2 Distribuição geográfica	6
1.3.3 Tipos de habitat	7
1.3.4 Biologia da espécie <i>B. glabrata</i>	7
1.4 O Parasita – <i>S. mansoni</i>	9
1.4.1 Taxonomia de <i>S.mansoni</i>	9
1.4.2 Ciclo de vida de <i>S. mansoni</i>	10
1.4.3 Relações Hospedeiro Intermediário – Parasita.....	12
1.5 A Schistosomose	14
1.5.1 Epidemiologia	14
1.6 Aplicação da Biologia Molecular ao estudo de moluscos hospedeiros intermediários	15
1.6.1 Exemplos de técnicas moleculares aplicadas	16

Capítulo II - Objectivos

2.1 Objectivo Geral	19
2.2 Objectivos específicos.....	19

Capítulo III - Material e Métodos

3.1 Selecção dos moluscos	21
---------------------------------	----

3.2 Obtenção de isolados de <i>S. mansoni</i>	21
3.2.1 Perfusão do fígado	21
3.2.2. Recolha de ovos	22
3.3 Infecção dos moluscos.....	23
3.3.1 Obtenção de cercárias	23
3.3.2. Monitorização da susceptibilidade da infecção	23
3.3.3 Tratamento estatístico de dados	24
3.4 Dissecção de moluscos	24
3.5 Análise aleatória de polimorfismos de DNA (RAPD-PCR)	24
3.5.1 Extracção de DNA	24
3.5.2 Quantificação do DNA genómico	25
3.5.3 Amplificação do DNA através do RAPD-PCR	26
3.5.4 Electroforese em gel de agarose.....	27
3.5.5 Análise de polimorfismos	28

Capítulo IV - Resultados

4.1 Estudo da susceptibilidade intraespecífica	30
4.1.1 Comparação da mortalidade entre albinos e selvagens infectados e não infectados	30
4.1.2 Comparação da susceptibilidade intraespecifica	31
4.2 Análise de polimorfismos de RAPD – PCR.....	36
4.2.1 Quantificação de DNA genómico	36
4.2.2 Identificação de polimorfismos	36

Capítulo V - Discussão

5.1 Comparação da susceptibilidade das estirpes albina e selvagem de <i>B. glabrata</i>	47
5.2 Comparação genética de polimorfismos da estirpe albina e selvagem de <i>B.glabrata</i>	49

Capítulo VI - Conclusões

6. Conclusões	53
---------------------	----

Capítulo VII - Referências Bibliográficas

7. Referências Bibliográficas	55
-------------------------------------	----

Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer à Prof.^a Catedrática Maria Amélia Grácio pela sua disponibilidade e conhecimento partilhado ao longo destes dois anos.

À Prof.^a Doutora Maria Manuela Calado, co-orientadora deste trabalho, pelo apoio incondicional, empenho e pelos conselhos durante toda a investigação.

À Prof.^a Doutora Luzia Gonçalves pelo auxílio no tratamento estatístico exigido para a realização deste trabalho.

Aos professores e mestres como também aos auxiliares da Unidade de Helminologia e Microbiologia Médicas do Instituto de Higiene e Medicina Tropical de Lisboa, pela partilha de conhecimento e apoio durante a realização das experiências.

Ao Prof. Doutor Jorge Atouguia que me despertou para uma área deveras interessante, com as suas aulas de parasitologia leccionadas durante a minha licenciatura.

Às minhas colegas Silvânia Leal, Ângela Velez e Sheila Cardoso pelo companheirismo e entreajuda.

Por último, mas não menos importante, aos meus pais e namorado pela força e o apoio incondicional que depositaram em mim, mesmo nos momentos mais difíceis, uma vez que sem a sua ajuda não teria chegado aqui.

A todos, um muito obrigado.

Resumo

A procura de marcadores associados à resistência e à susceptibilidade tem sido um dos grandes desafios propostos aos parasitologistas. Considerando que as estirpes albinas e selvagens de *B. glabrata* são susceptíveis à infecção por *S. mansoni*, o presente estudo tem como objectivo contribuir para o conhecimento da diferenciação genética das duas estirpes. O estudo integrou a observação da eliminação de cercárias num período de 12 semanas e a verificação das taxas de mortalidade e de infecção em diferentes moluscos não infectados e infectados. Para a comparação genética recorreu-se a técnica de RAPD-PCR, com a aplicação de diferentes *primers* de modo a associar possíveis polimorfismos, a uma maior ou menor susceptibilidade do molusco à exposição a miracídios. Os resultados obtidos demonstraram que a estirpe albina possuía maior susceptibilidade através da libertação de maior número de cercárias, apresentando também uma maior taxa de mortalidade. A nível genético, com recuso ao coeficiente de Dice, verificou-se uma maior diferença genética entre as estirpes sugerindo uma adaptação genética distinta, em relação à diferença entre os períodos de pré e pós exposição a miracídios de *S. mansoni*, dentro da mesma estirpe.

Palavras-chave: *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni*, RAPD, polimorfismos, resistência, susceptibilidade.

Abstract

*The searching for new genetic markers associated to the resistance and susceptibility of *B. glabrata* from the parasite has been a great challenge for the parasitologists, during the last years. Considering that albino and wild strains are susceptible to the *S. mansoni* infection, the objective of this study is to contribute for the knowledge of the genetic differentiation of those two strains. This study integrated the observation of elimination of cercariae for 12 weeks and the calculation of mortality and infection rates, in non-infected and infected snails. For genetic differentiation was employed RAPD-PCR technique, with different primers, in order to associate probable polymorphisms to the susceptibility rate of the snail to the *S. mansoni* infection. The results showed greater susceptibility to infection in the albino strain, through higher cercariae shedding and higher mortality rate. In genetics terms and through Dice's coefficient, was observed a greater difference between the strains, than between de periods before and after exposure to *S. mansoni* miracidia, suggesting a distinctive genetic adaptation.*

Keywords: *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni*, RAPD – PCR, polymorphism

Índice de Figuras

Figura 1 – A- <i>B. glabrata</i> estirpe albina; B – <i>B. glabrata</i> estirpe selvagem	4
Figura 2 – Distribuição de <i>B. glabrata</i> na região Neotropical (Adap. Brown 1980; Malek, 1980)	6
Figura 3 – C- Posturas 1º dia (com 6 embriões); D – Posturas 5º dia	8
Figura 4 – <i>S. mansoni</i> ; 1- macho; 2- fêmea	9
Figura 5 – Ciclo biológico do <i>S. mansoni</i> (Adap. Paz, 1997).....	11
Figura 6 – Processo para a libertação de cercárias	23
Figura 7 – Média de cercárias eliminadas pelos moluscos das estirpes albina e selvagem de <i>B. glabrata</i> , ao longo de 12 semanas.....	32
Figura 8 – Quantificação de DNA de <i>B. glabrata</i> – A.N.I. albino não infectado, S.N.I. selvagem não infectado, A.I. albino infectado, H. I. híbrido infectado, S. I. selvagem infectado; M - Marcador de peso molecular (HypperLadder, 1000pb).....	36
Figura 9 – Amplificação do DNA de moluscos <i>B. glabrata</i> , da estirpe albina, infectados (A1-A9) e da estirpe selvagem, infectados (S1-S9) com o <i>primer</i> Seq. 20; M – Marcador de peso molecular (HypperLadder, 2000pb).....	37
Figura 10 – Amplificação do DNA de moluscos <i>B. glabrata</i> , da estirpe albina, infectados (A1-A9) e da estirpe selvagem, infectados (S1-S9) com o <i>primer</i> Seq. 21; M – Marcador de peso molecular (HypperLadder, 2000pb).....	38
Figura 11 – Amplificação do DNA de moluscos <i>B. glabrata</i> , da estirpe albina, não infectados (Ani1-Ani8) e da estirpe selvagem, não infectados (Sni1-Sni8) com o <i>primer</i> Seq. 20; M – Marcador de peso molecular (HypperLadder, 2000pb)	39

Figura 12 – Amplificação do DNA de moluscos <i>B. glabrata</i> , da estirpe albina, não infectados (Ani1-Ani8) com o <i>primer</i> Seq. 20; M – Marcador de peso molecular (HypperLadder, 2000pb)	41
Figura 13 – Amplificação do DNA de moluscos <i>B. glabrata</i> , da estirpe albina, infectados (A1-A9) com o <i>primer</i> Seq. 20; M – Marcador de peso molecular (HypperLadder, 2000pb).....	41
Figura 14 – Amplificação do DNA de moluscos <i>B. glabrata</i> , da estirpe selvagem, não infectados (Sni1-Sni8) com o <i>primer</i> Seq. 20; M – Marcador de peso molecular (HypperLadder, 2000pb)	42
Figura 15 – Amplificação do DNA de moluscos <i>B. glabrata</i> , da estirpe selvagem, infectados (S1-S9) com o <i>primer</i> Seq. 20; M – Marcador de peso molecular (HypperLadder, 2000pb)	42
Figura 16 – Amplificação do DNA de moluscos <i>B. glabrata</i> , da estirpe albina, não infectados (Ani1- Ani7) com o <i>primer</i> Seq. 21; M – Marcador de peso molecular (HypperLadder, 2000pb)	43
Figura 17 – Amplificação do DNA de moluscos <i>B. glabrata</i> , da estirpe albina, infectados (A1-A9) com o <i>primer</i> Seq. 21; M – Marcador de peso molecular (HypperLadder, 2000pb).....	43
Figura 18 – Amplificação do DNA de moluscos <i>B. glabrata</i> , da estirpe selvagem, não infectados (Sni1-Sni7) com o <i>primer</i> Seq. 21; M – Marcador de peso molecular (HypperLadder, 2000pb)	44
Figura 19 – Amplificação do DNA de moluscos <i>B. glabrata</i> , da estirpe selvagem, infectados (S1-S9) com o <i>primer</i> Seq. 21; M – Marcador de peso molecular (HypperLadder, 2000pb)	44

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Sequência oligonucleotídica de <i>primers</i> testados.....	26
Tabela 2 – Condições térmicas do RAPD – PCR aplicado.....	27
Tabela 3 – Mortalidade em moluscos das estirpes albina e selvagem de <i>B. glabrata</i> infectados e não infectados.....	30
Tabela 4 – Infecção de moluscos das estirpes albina e selvagem de <i>B.glabrata</i> expostos a <i>S.mansoni</i>	31
Tabela 5 – Medidas descritivas da libertação semanal de cercárias paras as estirpes albinas e selvagens de <i>B. glabrata</i>	33
Tabela 6 – Teste estatístico não paramétrico Mann-Whitney aplicado à libertação semanal de cercárias de ambas as estirpes de <i>B.glabrata</i>	35
Tabela 7 – Coeficiente de Dice aplicado à diferença genética entre estirpes	40
Tabela 8 – Coeficiente de Dice aplicado à diferença genética entre estados de infecção.....	45

Abreviaturas

°C – graus Celsius

a.C. – antes de Cristo

d.d. - bidestilada

DNA – “*Desoxyrribonucleic acid*”- Ácido desoxirribonucleico (ADN)

EDTA – Ácido etilenodiaminotetraacético

g - gramas

h - horas

H₂O – água

ITS - “*Internal Transcribed Spacer*”

LS – PCR – “*Low stringency PCR*”- PCR de baixa estringência

mm – milímetro (10^{-3} Metros)

ml – mililitros (10^{-3} Litros)

mM – milimolar (10^{-3} Molar)

μL – microlitro (10^{-6} Litros)

NaCH₃COO- acetato de sódio

NaCl – cloreto de sódio

nm – nanómetro (10^{-9} Metros)

PCR – “*Polymerase Chain Reaction*”- Reacção de Polimerase em cadeia

pb – pares de bases

pH – potencial hidrogénio

RAPD – “*Random amplification of polymorphic DNA*” - Amplificação aleatória de polimorfismo de DNA

RFLP – “*Restriction Fragment Length Polymorphism*” -

RNA – “*Ribonucleic acid*” - ácido ribonucleico (ARN)

RNAr – “*ribosomal Ribonucleic acid*” - ácido ribonucleico ribossomal (ARNr)

SDS – Doudecil Sulfato de Sódio

T - Timina

r.c.f. - “*Relatival Centrifugal Force*”

r.p.m. – rotações por minuto

TBE – Tris Borato EDTA

TRIS – Tri-hidroximetilaminometano

U.V. – Ultra-Violeta

V - Volts

W - Watts

WHO – “*World Health Organization*” - Organização Mundial de Saúde (OMS)

Capítulo I - Introdução

1.1 Breves referências históricas sobre os moluscos

Os moluscos pertencem ao Phylo Mollusca que pelo estudo dos fósseis, remontam ao período do Câmbrico, ou seja, teriam surgido há cerca de 600 milhões de anos. O número actual de espécies de moluscos não é conhecido, mas pensa-se que esteja muito próxima de 150 000, em que 80 000 dessas espécies pertencem à classe Gastropoda (Malek & Cheng, 1974).

As primeiras referências a parasitas, em que estivessem envolvidos moluscos, foram feitas nos papiros de Ebers (1500 a.C.) (Grácio, 1981 e Kloos & David, 2002), levando a suspeitar que talvez correspondessem à infecção pelo *Schistosoma haematobium*. Esta suposição foi no entanto confirmada pela descoberta em 1910 por Ruffer, professor de patologia na Escola Médica do Cairo, de ovos calcinados de *S. haematobium* nos rins de duas múmias egípcias (Malek, 1988 e Grácio, 1981).

Mas só no séc. XVIII, com Swammendau (1737), se veio a conhecer o verdadeiro papel desempenhado pelos moluscos como hospedeiros intermediários de parasitas. A partir dessa altura os biólogos começaram a manifestar o seu interesse pela Malacologia Médica, interesse esse que aumentou ainda mais no princípio do séc. XIX, quando Bilharz descobriu o *Schistosoma*, causador da Bilharziose Vesical (1851) e com o conhecimento de que aquele parasita necessitava, no seu ciclo de vida, de um hospedeiro intermediário, molusco de água doce (Grácio, 1981).

A Malacologia, dado que estava ligada a doenças de carácter mais “agudo” só muito lentamente se foi impondo, sendo que só nos últimos anos, começou a ser conhecida como uma importante área de Biologia Aplicada e da Parasitologia (Malek & Cheng, 1974 e Grácio, 1981)

1.2 Generalidades sobre a classe Gastropoda

Como já foi referido anteriormente, é no Phylo Mollusca que se encontra a Classe Gastropoda, à qual se atribui grande importância na Medicina Tropical, por se tratar de hospedeiros intermediários de tremátodes patogénicos para o Homem. Considerados como o grupo mais numeroso e diversificado do Filo, os Gastropoda representam cerca de quatro quintos do mesmo.

São metazoários celomados de corpo não segmentado, de aspecto carnoso e protegidos em geral por uma concha que lhes serve de exosqueleto. A maioria dos gastrópodes são de origem marinha, existindo no entanto, algumas espécies terrestres (Guerreiro, 1993).

Nesta classe evidenciamos o género *Biomphalaria* (Preston, 1910), que abrange cerca de vinte espécies, estando amplamente distribuído por África, América do Sul, Caribe, sudoeste da Ásia (Arábia Saudita e Iémen), América Central e sul dos Estados Unidos (Malek & Cheng, 1974; Paraense, 1975 e Bandoni *et al.*, 1995).

Enquadramento taxonómico:

Filo: *Mollusca*

Classe: Gastropoda

Subclasse: Pulmonata

Ordem: Basommatophora

Família: *Planorbidae*

Género: *Biomphalaria*

Espécie: *B. glabrata* (Say, 1818)

1.3 Considerações gerais sobre *Biomphalaria glabrata*

1.3.1 Características morfológicas da espécie *B. glabrata*

O género *Biomphalaria* engloba os gastrópodes revestidos por uma concha discóide ou em forma de lente, que lhe serve de esqueleto e lhe confere protecção. Ao enrolar dá voltas em torno de um eixo, resultando num disco com bordas largas e um centro delgado. Em cada lado desenha-se então uma depressão que lembra um umbigo, facto que dá origem ao nome *Biomphalaria* (*bis*: dois; e *omphalos*: umbigo).

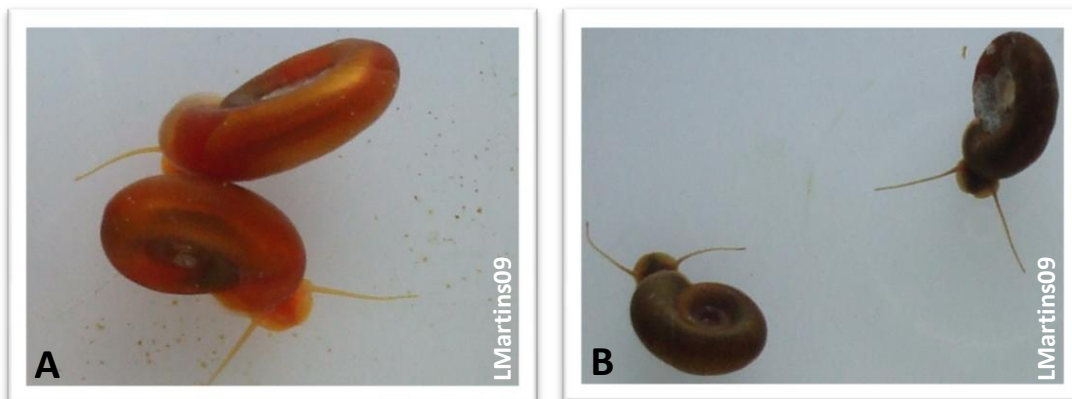


Figura 1 – **A** – *B. glabrata* estirpe albina; **B** – *B. glabrata* estirpe selvagem

No seu corpo podemos distinguir três regiões, quase sempre bem desenvolvidas, geralmente referidas como as partes moles do animal:

- cabeça, portadora dos órgãos de sentido;
- pé, muito musculado e ligado à cabeça;
- e ainda a massa visceral ou saco, que aloja os órgãos envolvidos por uma prega denominada por manto.

Estes gastrópodes possuem um aparelho digestivo completo, incluindo um saco ou bolbo bucal revestido com dentes – a rádula – e ainda uma glândula digestiva – o hepatopâncreas – que absorve e acumula reservas digestivas. Por este facto são considerados como animais fundamentalmente herbívoros.

A distribuição dos nutrientes pelas células dos moluscos é assegurada pela hemolinfa, frequentemente referida como o sangue. Nestes moluscos apresenta-se apenas um único tipo de célula, o amebócito, que se torna muito activo na fagocitose (Malek, 1980). O sistema circulatório é essencialmente constituído por um coração, sistema arterial e venoso e um sistema de seios sanguíneos (Baker, 1945).

A nível do sistema excretor, o rim constitui o principal órgão, ainda que funções idênticas sejam realizadas pelo hepatopâncreas, pela parede do saco pericárdico e pelos amebócitos da hemolinfa (Malek & Cheng, 1974).

A cavidade paleal (respiratória ou pulmonar), localizada na parte interna do manto, comunica com o exterior através de um sifão – o pneumóstoma – constituindo deste modo o sistema respiratório, do tipo aeróbio.

Sendo animais hermafroditas, o sistema reprodutor da *Biomphalaria* é composto por uma glândula e um canal hermafrodita – ovotéstis e oviespermático (respectivamente) – possuindo ainda duas genitálias, uma feminina e outra masculina.

O sistema nervoso, por sua vez, consiste em gânglios centrais e periféricos, células ganglionares, nervos e ainda os órgãos sensoriais, onde incluímos os olhos e os tentáculos, os estatocistos e o ostrádio.

1.3.3 Tipos de habitat

Como já foi referido no ponto anterior, estes tipos de moluscos podem ser encontrados em águas doces das regiões tropicais. Estas águas são geralmente pouco profundas (Fraga de Azevedo, 1955), algo poluídas e de fraca corrente. São ricas em matéria orgânica resultante de detritos vegetais.

A preferência destes gastrópodes recai em águas mineralizadas (ricas em sais alcalinos entre outros minerais) com fundo lodoso e expostos ao sol, variando a temperatura entre 22°C e os 25°C. A exposição ao sol permite o florescimento da vegetação aquática e conseqüentemente uma maior abundância da microflora, alimento destes moluscos (Malek, 1958).

Podem ser também encontrados em tanques, represas, rios de fraco caudal e com fundo pedregoso e ainda em locais nas proximidades de povoações (Fraga de Azevedo, 1955).

1.3.4 Biologia da espécie *B. glabrata*

O seu ciclo biológico é essencialmente diplóide ($2n$) desde a formação do ovo, estadios jovens e adulto, até à produção dos gâmetas de cuja conjugação resulta a formação do ovo.

Como já foi referido anteriormente, estes moluscos são hermafroditas apresentando o ovotéstis e produzindo simultaneamente gâmetas femininos e masculinos no mesmo indivíduo possibilitando, quando isolados, a auto fecundação. Estas características biológicas são evolutivamente muito importantes, fornecendo ao organismo a capacidade de estabelecer colónias a partir de um indivíduo, enquanto mantém variações genéticas através da reprodução sexual (Paraense, 1955) *cit. por* Vidigal *et al.*(1998).

As posturas de *Biomphalaria* apresentam-se como massas de consistência gelatinosas e transparentes (**Figura 3**), e possuem vários ovos unidos a um suporte sólido flutuante ou submerso, sendo envolvidas por uma membrana externa, a cápsula ovífera. Através de uma observação diária é possível seguir o desenvolvimento do ovo.

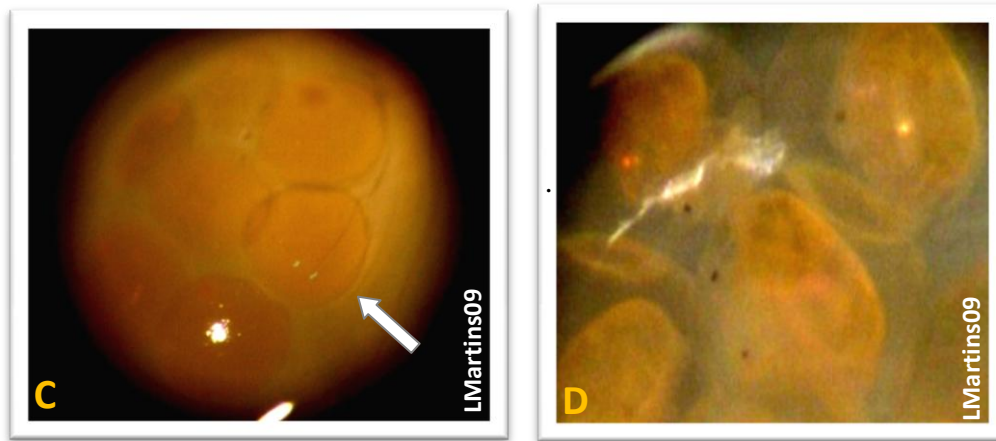


Figura 3 – C - Posturas 1º dia (com 6 embriões); D – Posturas 5º dia

Guerreiro (1993) cita que, segundo Lagrange (1957) e Kawazoe (1976), os ovos eclodem muito mais lentamente no Inverno que no Verão, em condições experimentais de laboratório.

No ambiente a sobrevivência dos planorbídeos é normalmente de um ano, sendo que a sua persistência no meio, esteja associada ao ritmo de reprodução dependente de factores ecológicos como o número de posturas, a fecundidade e a viabilidade dos ovos (Caldeira, 1999).

1.4 O Parasita – *S. mansoni*

1.4.1 Taxonomia de *S.mansoni*

Filo: *Platyhelminthes*

Classe: Trematoda

Subclasse: Digenea

Ordem: Strigeiformes

Família: *Schistosomatidae*

Gênero: *Schistosoma*

Espécie: *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907)

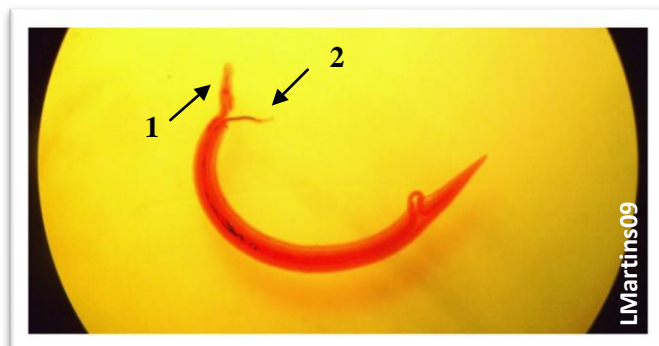


Figura 4 – *S. mansoni*: 1-macho; 2- fêmea

Os membros do género *Schistosoma* são dióicos, ou seja, possuem os sexos separados ao contrário dos outros tremátodes, apresentando também um acentuado dimorfismo sexual. O macho, de coloração esbranquiçada, mede cerca de 1cm (0,6 – 1,4 cm), tem margens laterais enroladas de modo a formar um canal longitudinal – o canal ginecóforo – o qual serve para alojar a fêmea durante a copulação. Por outro lado, a fêmea alcança os 1,2 -1,6 cm, é cilíndrica e mais delgada, e apresenta uma cor mais acinzentada derivada da digestão do sangue – a hemozoína.

De entre as espécies que podem infectar o homem podemos citar:

- *S. haematobium* (Bilharz, 1852)
- *S. japonicum* (Katsurada, 1904)
- *S. mansoni* (Sambon, 1907)
- *S. matthei* (Veglia & Le Rout, 1929)
- *S. intercalatum* (Fisher, 1934)
- *S. mekongi* (Voge, Bruckner & Bruce, 1978)
- *S. malayensis* (Creer, Ow-Yang & Yong, 1988)

Algumas espécies podem ser diferenciadas pela posição do esporão dos ovos, a qual é lateral no caso do *S. mansoni*. Estes ovos possuem a particularidade de não serem operculados ao contrário dos outros tremátodes. No seu interior, os ovos albergam os miracídios, formas larvares, ciliadas e infectantes para o molusco.

1.4.2 Ciclo de vida de *S. mansoni*

O miracídio do *S. mansoni* penetra activamente no tegumento do molusco, neste caso da *B. glabrata*. A penetração do miracídio no hospedeiro deve efectuar-se dentro das primeiras horas após a eclosão, pois o poder invasivo cai em função da idade do miracídio e reduz-se praticamente a zero depois das 10h a 12h seguintes (Rey, 2003). Após a penetração, os miracídios alojam-se em diversos tecidos do molusco, transformando-se em esporocistos de 1ª geração (24h após penetração), seguindo-se a 2ª e a 3ª gerações. Após duas semanas inicia-se a produção de cercárias, que posteriormente migram através do molusco para o abandonarem até atingirem a água. Esta eliminação é diária.

A procura dos hospedeiros definitivos é feita na água e, ao encontrá-los, penetram na pele. A cauda fica no exterior e a forma larvar recebe o nome de schistosomulo. Uma vez alcançada a circulação portal intra-hepática, os parasitas transforma-se em adultos, acasalam e as fêmeas começam a depositar ovos já embrionados, os quais alcançam o lúmen do intestino, no caso do *S. mansoni*.

Os ovos podem ser eliminados com as fezes, podendo no entanto, penetrar no vaso sanguíneo da circulação portal, aqueles que não conseguem alcançar o caminho certo, entrando deste modo no fígado e originando a patologia. Por outro lado, dos ovos eliminados que atinjam as coleções de água com condições físico-químicas adequadas, eclodem os miracídios que irão procurar o hospedeiro intermediário (**Figura 5**).

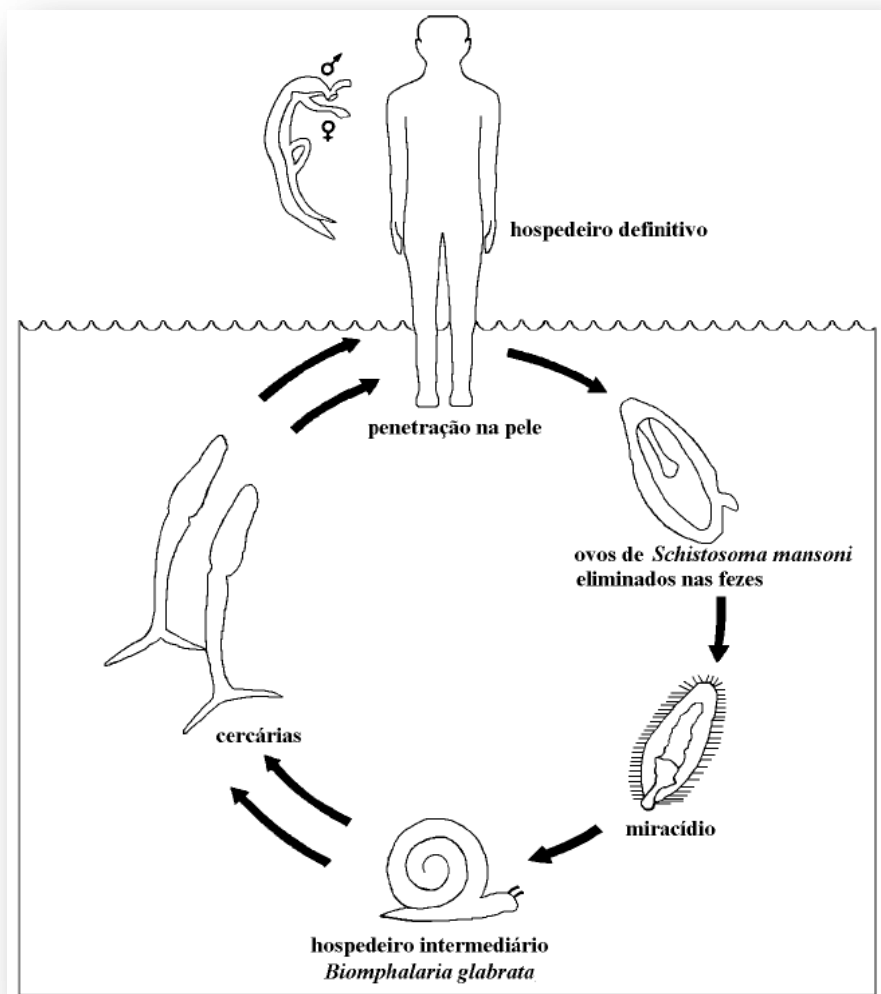


Figura 5 – Ciclo biológico de *S. mansoni* (Adap. Paz, 1997)

1.4.3 Relações Hospedeiro Intermediário – Parasita

O modelo experimental mais utilizado para o estudo das interações Digenea – molusco é o *S. mansoni* e o *B. glabrata* (Sire *et al.*, 2001).

Para que ocorra sucesso de infecção de *B. glabrata* pelo *S. mansoni* é necessário a verificação de determinados aspectos, nomeadamente a compatibilidade entre os mesmos. No entanto, essa compatibilidade necessita da existência de concordância entre a infectividade do parasita e a susceptibilidade do molusco. A infectividade do parasita é a capacidade deste encontrar e penetrar o hospedeiro, evitando ou suprimindo a resposta imunológica do mesmo. Por outro lado, a susceptibilidade diz respeito à sua adequabilidade fisiológica e ausência de uma resposta, ou seja, apresenta uma base genética da variação entre as populações de parasitas e hospedeiros (Adema & Locker, 1977).

A nível de relações hospedeiro-parasita sabe-se que os estádios larvares do parasita – miracídio, esporocistos e cercárias - provocam lesões no molusco (Malek, 1958):

- Mecânicas - quando as larvas migram para atingir os órgãos distais;
- Fisiológicas - dependentes da população parasitária, acumulando substâncias tóxicas (Malek, 1957);
- Morfológicos - através da visualização a olho nú de tumores nos tentáculos, cabeça ou pé (Lutz, 1919 e Brump 1940,1941) *cit. por* Guerreiro, 1993.

A infecção com *S. mansoni* pode ainda afectar a capacidade reprodutora do caracol, devido à destruição do ovotéstis, reduzindo o número de posturas, chegando mesmo a cessar a sua produção (Coelho, 1954 e Pan, 1965).

Esta infecção pode ainda causar-lhes alterações no crescimento e no ciclo biológico, nomeadamente provocando-lhes morte prematura (amiúde), facto demonstrado por Pan (1965) no estudo que revelou uma maior incidência de morte em moluscos parasitados.

As populações de *B. glabrata* que ocorrem na natureza são muito polimórficas no que respeita à sua compatibilidade com *S. mansoni* (Théron *et al.*, 1997 e Sire *et al.*, 2001).

Deste modo, estudos genéticos e dos mecanismos de interacção em associação com a variabilidade genética da *B. glabrata* têm vindo a ser explorados para o desenvolvimento de estirpes ou espécies laboratoriais de moluscos refractários, ou seja, resistentes à infecção por *S. mansoni* (Adema & Locker, 1977).

1.5 A Schistosomose

1.5.1 Epidemiologia

B. glabrata é o hospedeiro intermediário do tremátode *S. mansoni*, agente etiológico da Schistosomose¹, parasitose endémica em muitos países de África e da América do Sul e Antilhas (Rey, 2003). É a parasitose mais prevalente no Mundo, seguida da Malária (Morel, 2000). Designa-se por Schistosomose intestinal, dada a localização do parasita nas veias do intestino grosso e recto, apresentando no hospedeiro definitivo sintomas predominantemente intestinais.

Estima-se que 600 milhões de pessoas corram risco de infecção e que mais de 200 milhões estejam infectadas (WHO, 1993) em 74 países, valores possivelmente subestimados, pois os sintomas relacionados com a Schistosomose, como anemia e baixa taxa de crescimento, podem não ser reconhecidos como efeitos da doença (WHO, 2002). Alguns dados indicam que 120 milhões são sintomáticos, 20 milhões apresentam doença severa, e que a parasitose está ainda relacionada com 500.000 mortes por ano (Gibodat & Bergquist, 2000).

A sua importância reside no facto da doença não afectar apenas a saúde e o estado psicológico das pessoas infectadas, como também altera a sua produtividade e, conseqüentemente, as questões económicas dos países endémicos (Haggag & El-Sherbiny, 2006).

¹ Ou Schistosomiase (Bilharziase ou Bilharziose).

1.6 Aplicação da Biologia Molecular ao estudo de moluscos hospedeiros intermediários

Estudos moleculares de hospedeiros invertebrados têm sido iniciados como meio de análise da expressão génica e da sua influência no desenvolvimento do parasita. A este nível o genoma mitoncondrial da *B. glabrata* foi já sequenciado, mostrando uma forma circular em que os nucleótidos AT representam cerca de 74%, existindo num total aproximado de 13,670.

Esta descodificação veio facilitar as investigações da biologia de *B. glabrata* e as interações entre o molusco e os estadios de *S. mansoni*. Espera-se, em virtude disto, que o conhecimento da expressão génica dos hospedeiros intermediários e parasitas, possa eventualmente conduzir a novos métodos de controlo da doença, como também ao esclarecimento da sua epidemiologia (Kinght *et al.*, 2000). Estas pesquisas tornaram-se deste modo uma ferramenta adicional à identificação morfológica estabelecendo protocolos associados, principalmente à técnica de PCR e as suas variações, permitindo distinguir as diferentes espécies, através de perfis específicos (Caldeira *et al.*, 1998 e Vidigal *et al.*, 2000).

Desde a década de 90 do século XX, que uma das estratégias para controlo genético da Schistosomose se baseia no desenvolvimento da genética de espécies de moluscos, de forma a modificar a susceptibilidade natural para um estado resistente, através da introdução de moluscos refractários nos habitats naturais (Spada *et al.*, 2002 e Coelho *et al.*, 2004).

Estudos anteriores foram feitos para determinar que componente genético do molusco influencia quer a sobrevivência quer a destruição da infecção pelo parasita. Diversas isoenzimas têm sido estabelecidas levando a vários fenótipos resistentes e susceptíveis (Richards & Shade, 1987 e Lewis *et al.*, 1993). De facto, estas pesquisas foram realizadas pioneiramente por Newton em 1955, assumindo que o fenótipo da estirpe albina possuía alto grau de susceptibilidade à infecção.

Demonstrada a sua alta variabilidade genética (Knight *et al.*, 1991 e Vidigal *et al.*, 1994) cit. por Coelho *et al.* 2004, recentemente diferentes regiões de DNA têm sido propostas para estudos moleculares como instrumento adicional nas características morfológicas de *Biomphalaria* spp.

Posto isto, diversas técnicas de biologia molecular têm sido aplicadas para estudos da variabilidade genética dos hospedeiros intermediários do *Schistosoma* spp. (Knight *et al.*, 1991; Vidigal *et al.*, 2000, 2001; Caldeira *et al.*, 2000; Janotti-Passos & Souza, 2000; Knight *et al.*, 2000 e Souza & Janotti-Passos, 2001).

1.6.1 Exemplos de técnicas moleculares aplicadas

■ LS – PCR - *Low Stringency*

Vidigal *et al.* (1994) demonstraram a heterogeneidade genética de *B. glabrata* a uma grande variedade de marcadores genéticos polimórficos. Para isso, recorreram à técnica de LS com uso de dois *primers* específicos (NS1 e ET1) e em condições de baixa estrigência de anelamento. Mesmo que esses *primers* produzissem complexos de bandas, pelos menos quatro produtos de LS para *Biomphalaria* foram específicos, independentemente da origem dos moluscos (Vidigal *et al.*, 1996).

■ RFLP – PCR - *Restriction Fragment Length Polymorphism*

A técnica de PCR- RFLP baseia-se na amplificação específica de uma região do DNA pela PCR com posterior digestão do produto com enzimas de restrição, esses produtos podem ser observados após electroforese (Vidigal *et al.*, 1998; Caldeira *et al.* 1998; Spatz *et al.*, 1999 e

Vidigal *et al.*, 2000). Estes autores amplificaram a região espaçadora interna do género RNAr, constituído por 3 regiões conservadas; 18S, 5.8S e 28S além de mais duas zonas ITS1 e ITS2.

■ RAPD – PCR – *Random Amplified Polymorphism DNA*

O uso de RAPD (Welsh & McClelland, 1990 e Williams *et al.*, 1990), uma outra variante da técnica de PCR, associa possíveis marcadores polimórficos relacionados com resistência e susceptibilidade à infecção por *S. mansoni*, amplificando-os, visto que permite o uso de pequenos nucleótidos arbitrários, sem a necessidade de conhecer previamente os genes ou sequências. Geralmente utiliza-se um iniciador único de sequências aleatórias em condições de baixa estringência de anelamento. Isto permite a ligação de iniciadores a múltiplos sítios do genoma, amplificando segmentos anónimos sem correlação obrigatória, com regiões transcritas ou não, repetitivas ou não, variáveis ou conservadas.

Vidigal *et al.* (1994) usaram a técnica de RAPD-PCR para estudos da variabilidade genética na *B. glabrata*. Larson *et al.* (1996) e Lewis *et al.* (1997) desenvolveram estudos entre estirpes de *B. glabrata*, susceptíveis e resistentes à infecção por *S. mansoni*. Estudos similares foram concretizados por Abdel – Hamid *et al.*, (1999), usando moluscos de outra espécie *B. tenagophila*. Outros autores prosseguiram com pesquisas semelhantes na detecção de marcadores associados à resistência da infecção por *S. mansoni*: Knight *et al.* (1999, 2000), Spada *et al.* (2002), Abdel Hamid *et al.* (2006), Haggag & El-Sherbiny (2006), Oliveira *et al.* (2008) e Banaja *et al.* (2008)

Em suma, a técnica de RAPD – PCR mostra ser especialmente indicada para a realização de estudos de espécies desconhecidas, por utilizar pequenos *primers* e sequências arbitrárias. Possui um grande potencial para detectar polimorfismos e, sendo uma ferramenta de baixo custo, torna-se acessível a muitos laboratórios, permitindo a estimativa de parâmetros genéticos num curto espaço de tempo (Lacerda *et al.*, 2002).

Capítulo II - Objetivos

2.1 Objectivo Geral

Comparar a variação genética das estirpes albina e selvagem de *B. glabrata* nos períodos de pré e pós exposição a miracídios de *S. mansoni*.

2.2 Objectivos específicos

- Relacionar a mortalidade entre as duas estirpes e entre os diferentes períodos pré e pós exposição a miracídios de *S. mansoni*;
- Estudar a susceptibilidade das diferentes estirpes mantidas em laboratório ao longo de 12 semanas, após a infecção com 10 miracídios de *S. mansoni*;
- Identificar de polimorfismos genéticos com auxílio de técnicas moleculares - RAPD - que poderão estar associadas ao maior ou menor grau de susceptibilidade das estirpes de *B. glabrata* - selvagem e albina.

Capítulo III – Material e Métodos

3.1 Selecção dos moluscos

Os moluscos foram seleccionados aleatoriamente a partir da colónia existente e mantida ao longo de várias gerações, na Unidade de Helminologia e Malacologia Médica do Instituto de Higiene e Medicina Tropical. Foram seleccionados 50 exemplares de cada uma das estirpes, albina e selvagem, para posterior exposição a miracídeos de *S. mansoni*. Para grupo controlo foram seleccionados 50 exemplares de cada estirpe, não sujeitos à exposição a miracídeos. O parâmetro inicial de selecção foi o diâmetro da concha (5 - 10 mm). Foram mantidos em recipientes com 200 ml de água com temperatura de $24^{\circ}\text{C}\pm 1$ e a sua manutenção foi efectuada de dois em dois dias com a reposição da água e o fornecimento de alface fresca. Durante o estudo foram contabilizadas as posturas e os embriões com o auxílio de um estereomicroscópio.

3.2 Obtenção de isolados de *S. mansoni*

Para a obtenção de isolados de *S. mansoni* foi aplicada a técnica de Duvall & Dewitt (1967), adaptado pela UHMM/UPMM/IHMT.

3.2.1 Perfusão do fígado

Inocularam-se os *Mus musculus* intraperitonealmente com 0,4 ml de Pentothal® sódico (20mg). Após a morte do murganho (5-10 minutos), fez-se a incisão transversal na pele, abriu-se a cavidade abdominal e a torácica e cortou-se o esterno. Removeu-se o diafragma e parte da grelha costal, com ajuda de uma tesoura. Lavaram-se as vísceras do murganho em água tépida para remoção das impurezas. Levantou-se o fígado e com o bisel de uma agulha fez-se a incisão na veia porta. Após o desvio do pulmão direito para o pulmão esquerdo, introduziu-se uma agulha na artéria

torácica e injectou-se lentamente cerca de 10 ml de Líquido de Perfusão (7,5 g de NaCH_3COO / 8,5 g de NaCl / 1000 ml de H_2O), provocando o arrastamento de vermes contidos nos vasos hepáticos directamente para o copo cónico. Lavaram-se novamente as vísceras para assegurar que não se perderam parasitas. Por fim, fez-se a dissecação do fígado para recuperação dos parasitas que ficaram retidos. Após a sedimentação dos vermes, desprezou-se o sobrenadante e voltou-se a encher o copo com água repetindo a operação anterior para que houvesse uma melhor limpeza dos vermes que foram arrastados. No fim, verteu-se o sedimento contendo os vermes para uma caixa de Petri e procedeu-se à contagem de fêmeas e machos recorrendo a um estereomicroscópio.

3.2.2 Recolha de ovos

Triturou-se o fígado do murganho com o auxílio de uma varinha mágica em solução salina (1,75% NaCl), para a destruição dos tecidos hepáticos e se dar a libertação dos ovos. Depois do macerado se encontrar totalmente homogeneizado, verteu-se a mistura para um copo de fundo cónico. Filtrou-se a suspensão com duas espessuras de gaze e deixou-se repousar durante 20 minutos a 4°C . Fizeram-se várias lavagens e uma vez conseguida a transparência necessária, decantou-se a suspensão, guardando o sedimento. Filtrou-se novamente a suspensão com duas camadas de gaze, possibilitando assim a recolha de ovos do parasita. Para estimulação dos miracídios adicionou-se um pouco de água morna e expôs-se à luz artificial com lâmpada de 60W.

3.3 Infecção dos moluscos

Procedeu-se à exposição individual dos moluscos a 10 miracídeos utilizando tubos de Willis contendo cerca de 5 ml de água, à temperatura entre 25°C – 25,5°C, durante 2h a 3h. Os moluscos foram posteriormente agrupados por estirpe nos devidos recipientes.

3.3.1 Obtenção de cercárias

Para a obtenção de cercárias, os moluscos foram colocados individualmente em tubos de Willis com 10 ml de água e expostos à luz artificial de uma lâmpada de 60W durante, pelo menos, uma hora. Com ajuda de um estereomicroscópio procedeu-se à visualização de cercárias. Para determinação da susceptibilidade este procedimento foi iniciado 4 semanas após a exposição aos miracídeos de *S. mansoni* e monitorizado até 12 semanas após a exposição.

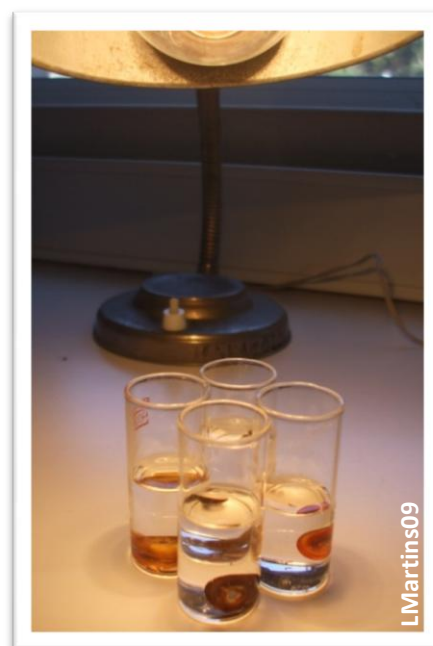


Figura 6 – Processo para libertação de cercárias

3.3.2 Monitorização da susceptibilidade da infecção

Após 1h a 2h da colocação dos moluscos à luz artificial, iniciou-se a contagem de cercárias. Para tal retirou-se 0,5 ml de água para uma lâmina juntamente com algumas gotas de lixívia, de modo a imobilizar as cercárias. Ao microscópio, esta contagem é repetida três vezes para cada molusco e a partir da média destas contagens extrapolou-se para o volume de 10 ml, através do cálculo da proporção.

3.3.3 Tratamento estatístico de dados

Para a avaliação do estudo da susceptibilidade da infecção em ambas as estirpes, criou-se uma base de dados registando o número de moluscos positivos para cercárias, o total de cercárias obtidas para cada molusco, como também o registo da mortalidade ao longo das semanas de estudo. Os cálculos realizados a partir desta base de dados foram feitos com recurso ao SPSS – “*Statistical Package for Social Science*” versão 17.0. O teste utilizado para este estudo foi o teste não paramétrico Mann-Whitney e calculou-se também a média, mediana, variância e desvio padrão, mínimo e máximo.

3.4 Dissecção de moluscos

O banho-maria foi preparado para atingir a temperatura de 70°C. Durante o seu aquecimento, foi feita a marcação dos tubos estéreis de 1,5 ml a serem utilizados com a adição de etanol absoluto. Com ajuda de uma pinça mergulhou-se o molusco no banho-maria durante 30 segundos. Posteriormente, com o auxílio de um estereomicroscópio e de um bisturi, procedeu-se ao corte da zona cefalopodal e colocou-se esse produto nos tubos anteriormente preparados.

3.5 Análise aleatória de polimorfismos de DNA (RAPD-PCR)

3.5.1 Extração de DNA

A extração genómica do DNA total foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Stothard *et al.* (1996), com as seguintes modificações:

Em tubos estéreis de 1,5 ml colocaram-se 600 µl de Tampão CTAB – (Cetyltrimethylammonium Bromide, Amnesco® – C₉H₄₂NBr). Posteriormente adicionaram-se 10 µl de Proteinase K e colocou-se a amostra. Homogeneizou muito bem com tampão previamente aquecido na estufa a 65°C. Seguidamente as amostras foram colocadas na estufa a 65°C durante 60 minutos. De seguida adicionaram-se 600 µl de Clorofórmio: Isoamyl (24:1). Fez-se a agitação por inversão durante 2 minutos e preparou-se uma centrifugação rápida, para que haja separação da parte aquosa da parte orgânica. Retirou-se o sobrenadante para novos tubos já com 800 µl de etanol absoluto gelado, para a visualização da precipitação. Centrifugou-se a 13000 r.p.m. (= ± 20000 r.c.f.) durante 20 minutos. Descartou-se o sobrenadante, adicionando de seguida 500 µl de etanol a 70%, para lavagem do “pellet”. Centrifugou-se novamente a 13000 r.p.m. (= ± 20000 r.c.f.) durante 20 minutos. Deixando escorrer, retirou-se o sobrenadante totalmente. Com auxílio da estufa a 55°C, evaporou-se o resto do etanol, num tempo máximo de 15 minutos. No final adicionaram-se 50 µl de TE (Tris EDTA, pH 7) e agitou-se o tubo de modo a que o “pellet” se dissolva. Posteriormente as amostras foram armazenadas a -20°C.

3.5.2 Quantificação do DNA genómico

Procedeu-se à quantificação do DNA genómico de modo a seleccionar as melhores amostras e evitar eventuais ausências de amplificação e, conseqüentemente, ausência de resultados. Como a principal causa de erro desta ausência é o excesso de DNA, quantificaram-se as amostras num gel de agarose a 1% com diferentes diluições do DNA em H₂O d.d. – 1/10, 1/20, 1/50 e 1/100. Os melhores resultados foram obtidos com a diluição 1/50 para ambas as estirpes.

3.5.3 Amplificação do DNA através do RAPD-PCR

A amplificação do DNA genómico foi realizado por reacção de PCR. As reacções de amplificação foram efectuadas em volumes de 25 µl, utilizando o kit Illustra™ puReTaq Ready-To-Go PCR Beads (GE Healthcare).

Em cada reacção de amplificação de PCR foi também incluída uma amostra negativa. Para as reacções de amplificação foi utilizado um conjunto de *primers* aleatórios descritos na **Tabela 1** e que já tinham sido utilizados por outros autores em diferentes estudos.

Tabela 1 – Sequência oligonucleotídica dos *primers* testados

Primers	Oligonucleótidos 5' → 3'	Autores
Seq. 2	TGC CGA GCT G	Abdel-Hamid <i>et al.</i> , 1999
Seq. 6	GGT CCC TGA C	Larson <i>et al.</i> , 1999
Seq. 9	GGG TAA CGC C	Vidigal <i>et al.</i> , 1994
Seq. 10	GTG ATC GCA G	Sire <i>et al.</i> , 1999
Seq. 20	AGT GCT ACG T	Vidigal <i>et al.</i> , 1994
Seq. 21	CAG GCC CTT C	Oliveira <i>et al.</i> , 2008

As reacções de amplificação aleatórias de polimorfismos foram efectuadas num termociclador (AVISO®, GmbH Mechatronic Systems) e com as condições térmicas, indicadas na **Tabela 2**.

Tabela 2 - Condições térmicas do RAPD – PCR aplicado

	T° / h	N° Ciclos
Desnaturação Inicial	95° C – 2 min	1x
1ª Etapa	95°C – 30 seg	2x
Extensão Interna	30°C – 2 min	
2ª Etapa	72°C – 1 min	
1ª Etapa	95°C – 30 seg	33x
Extensão Interna	30°C – 2 min	
2ª Etapa	72°C – 1 min	
Extensão final	72°C – 5 min	1x
	<u>Tempo Total</u>	3h23min

3.5.4 Electroforese em gel de agarose

Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose a 1,5%, suplementado com brometo de etídio (0,5 µl/ml), numa solução TAE (40 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA, pH 8,0). Para estimar o peso molecular de fragmentos amplificados, utilizou-se um marcador de massa molecular “HyperLadder II” (Bioline) de 2000pb. A migração ocorreu a 100V durante 60 minutos. As bandas de DNA foram visualizados após a exposição a raios U.V. no aparelho AlphaImager® HP, Alpha Innotech.

3.5.5 Análise de polimorfismos

A variação genética das duas estirpes em estudo foi analisada através das bandas obtidas em géis de agarose e avaliadas com recurso ao Coeficiente de Dice. Esta medida de associação consiste no estabelecimento de estimativas de máxima verossemelhança calculadas a partir de uma tabela de contingência. Este coeficiente, (**S**), foi descrito por Dice (1945) e é obtido pela seguinte fórmula: $(S) = 2a / 2a + b + c$, em que (a) representa o número de bandas comuns, (b) representa o número de bandas existentes apenas nos albinos e (c) o número de bandas existentes apenas nos selvagens. O valor (**S**) pode definir se as amostras são idênticas, similares ou diferentes.

Capítulo IV – Resultados

4.1 Estudo da susceptibilidade intraespecífica

4.1.1 Comparação da mortalidade entre albinos e selvagens infectados e não infectados

Neste estudo foi utilizado um total de 100 moluscos de *B. glabrata*, 50 deles da estirpe albina e outros 50 da estirpe selvagem e como controlo utilizaram-se 50 moluscos de ambas as estirpes, sem exposição a miracídios.

A maior percentagem de mortalidade verificou-se nos moluscos infectados da estirpe albina, em que 30 moluscos morreram durante o estudo (60%), enquanto nos da estirpe selvagem morreram 24 (48%). Em relação aos moluscos não expostos à infecção, observaram-se os mesmos resultados, verificando-se que na estirpe albina, houve um maior número de moluscos que morreram durante o espaço de tempo correspondente ao período pré-patente nos moluscos infectados (**Tabela 3**).

Tabela 3 – Mortalidade em moluscos das estirpes albina e selvagem de *B. glabrata* infectados e não infectados

Período (nº de semanas)	Albinos		Selvagens	
	Não infectados	Infectados	Não infectados	Infectados
1	2	2	1	1
2	2	3	1	2
3	1	3	2	1
4	1	4	3	2
5	2	6	1	2
6	1	2	3	3
7	1	3	2	4
8	1	2	2	3
9	3	1	1	1
10	2	1	1	2
11	2	2	1	2
12	2	1	0	1
Total	20(40%)	30(60%)	18(36%)	24(48%)

4.1.2 Comparação da susceptibilidade intraespecífica

O estudo da susceptibilidade foi realizado a partir da observação da libertação de cercárias de ambas as estirpes. Dos 100 exemplares observados (50 para cada estirpe), apenas 27 albinos libertaram cercárias, correspondendo a 54%. Nos selvagens cerca de 30 caracóis libertaram cercárias, correspondendo a 60%.

Na **Tabela 4** relaciona-se o número de moluscos vivos com o número de moluscos que eliminaram cercárias e indica-se a taxa de infecção para cada semana. Ambas as estirpes iniciam a sua libertação de cercárias na 5ª semana. Contudo, na estirpe selvagem, o número de moluscos que libertaram cercárias corresponde a apenas 14%, contrariamente aos 47% apresentados para os moluscos albinos. A variação do número de moluscos que libertaram cercárias, sugere uma curva gaussiana, atingindo um valor máximo na 8ª semana para albinos e um valor máximo na 7ª semana para os selvagens (**Tabela 4** e **Figura 7**).

Tabela 4 – Infecção de moluscos das estirpes albina e selvagem de *B. glabrata* expostos a *S. mansoni*

Período (Nº sem.)	Albinos			Selvagens		
	Nº moluscos vivos	Nº de moluscos positivos para cercárias	%	Nº moluscos vivos	Nº de moluscos positivos para cercárias	%
1	48	0	0	49	0	0
2	45	0	0	47	0	0
3	42	0	0	46	0	0
4	38	0	0	44	0	0
5	32	10	0,47	42	6	0,14
6	30	22	0,73	39	20	0,51
7	27	20	0,74	35	25	0,72
8	25	21	0,85	32	22	0,68
9	24	17	0,71	31	19	0,61
10	23	15	0,65	29	10	0,34
11	21	12	0,57	27	6	0,22
12	20	10	0,50	26	4	0,15

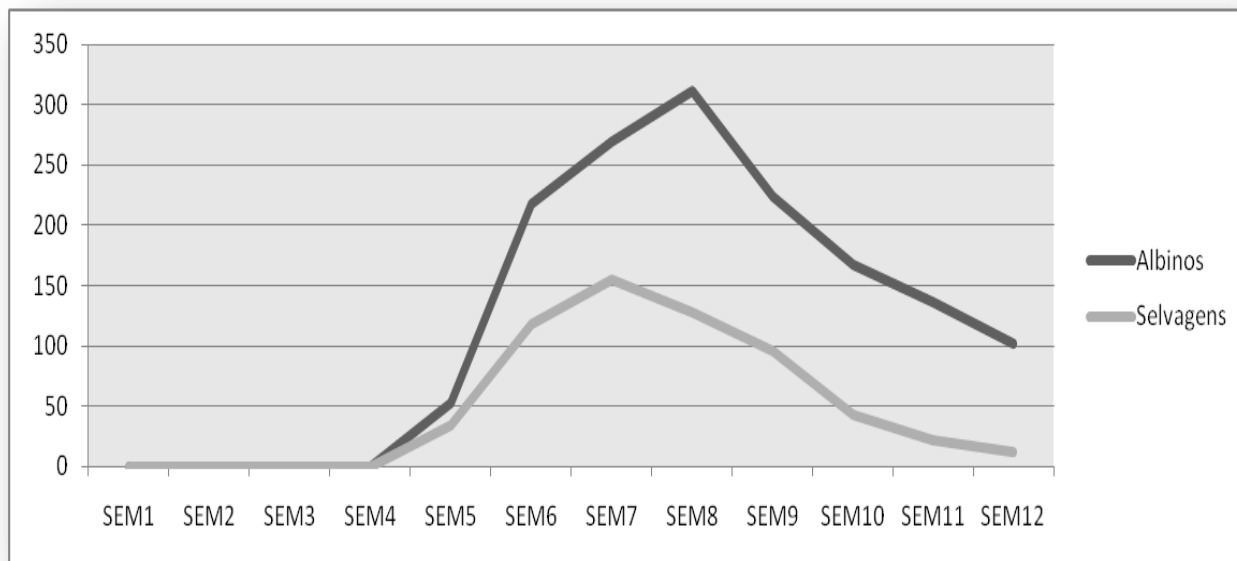


Figura 7 – Média de cercárias eliminadas pelos moluscos das estirpes albina e selvagem de *B. glabrata*, ao longo das 12 semanas

Nas **Tabela 5 e Figura 7** mostram-se os resultados da análise estatística relativa à libertação semanal de cercárias. Foram calculados a média, a mediana, o desvio padrão, máximos e mínimos, para cada estirpe em cada semana. As primeiras quatro semanas correspondem ao período pré-patente e apresentaram valores nulos (não apresentados na tabela). A partir da 5ª semana verificou-se que a média de libertação de cercárias é sempre superior na estirpe albina. A estirpe albina atingiu um pico entre a 8ª e a 9ª semana, em contrapartida, na estirpe selvagem este pico ocorreu entre a 6ª e a 7ª semana. A partir da 8ª semana o número de cercárias libertadas começou a decrescer, sugerindo um período patente mais curto, embora nas 12 semanas de estudo a eliminação de cercárias nunca cesse.

Tabela 5 – Medidas descritivas da libertação semanal de cercárias para as estirpes albina e selvagem

Grupo	Semana 5	Semana 6	Semana 7	Semana 8	Semana 9	Semana 10	Semana 11	Semana 12	
Albinos	Total	1690	6540	7270	7770	5377	3850	2875	2050
	Média	52,81	218,00	269,26	310,80	224,04	167,39	136,90	102,50
	Mediana	,00	240,00	340,00	350,00	200,00	190,00	180,00	40,00
	Variância	9820,867	26761,379	34268,661	26888,917	32668,389	25301,976	18588,690	14661,842
	D. padrão	99,100	163,589	185,118	163,978	180,744	159,066	136,340	121,086
	Minimo	0	0	0	0	0	0	0	0
	Máximo	360	580	560	540	560	460	400	360
	N	32	30	27	25	24	23	21	20
Selvagens	Total	1460	4620	5420	4100	2980	1240	600	300
	Média	34,76	118,46	154,86	128,13	96,13	42,76	22,22	11,54
	Mediana	,00	60,00	190,00	110,00	90,00	,00	,00	,00
	Variância	7801,161	17681,781	14313,950	12151,210	8864,516	4377,833	2125,641	781,538
	D. padrão	88,324	132,973	119,641	110,233	94,152	66,165	46,105	27,956
	Minimo	0	0	0	0	0	0	0	0
	Máximo	320	380	360	350	300	200	180	90
	N	42	39	35	32	31	29	27	26

Para complementar o estudo da distribuição da libertação de cercárias por semana, aplicou-se o teste estatístico não paramétrico de Mann-Whitney. Com este teste pretendeu-se verificar se a libertação de cercárias em ambas as estirpes seguia a mesma distribuição ou se havia diferenças estatisticamente significativas. A **Tabela 6** mostra que a partir da 6^a semana, o “*p*-value” é sempre inferior ao valor α ($\alpha = 0,05$). Isto sugere, segundo o teste estatístico Mann-Whitney, a existência de diferenças significativas quanto à distribuição semanal na libertação de cercárias entre a estirpe albina e a estirpe selvagem.

Tabela 6 – Teste estatístico não paramétrico Mann-Whitney aplicado à libertação de cercárias de ambas as estirpes de *B. glabrata*

	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6	Semana 7	Semana 8	Semana 9	Semana 10	Semana 11	Semana 12
Mann-Whitney U	1176,000	1057,500	966,000	836,000	571,000	378,500	282,000	142,500	218,000	184,000	153,500	152,000
Wilcoxon W	2401,000	2185,500	2047,000	1826,000	1474,000	1158,500	912,000	670,500	714,000	619,000	531,500	503,000
Z	,000	,000	,000	,000	-1,530	-2,571	-2,734	-4,175	-2,672	-2,973	-3,108	-2,938
p-value	1,000	1,000	1,000	1,000	,126	,010	,006	,000	,008	,003	,002	,003

a. Grouping Variable: Grupo

4.2 Análise de polimorfismos de RAPD – PCR

4.2.1 Quantificação de DNA genómico

Numa primeira etapa, procedeu-se à quantificação do DNA, permitindo seleccionar as amostras mais adequadas e evitar eventuais ausências de amplificação e resultados. Após a extração de DNA, as amostras foram quantificadas num gel de agarose a 1%, anteriormente diluídas com H₂O d.d., com as seguintes diluições - 1/10, 1/20, 1/50 e 1/100. Na **Figura 8** pode-se observar que os melhores resultados foram obtidos com a diluição 1/50, funcionando com ambas as estirpes e nos estados infectado e não infectado.

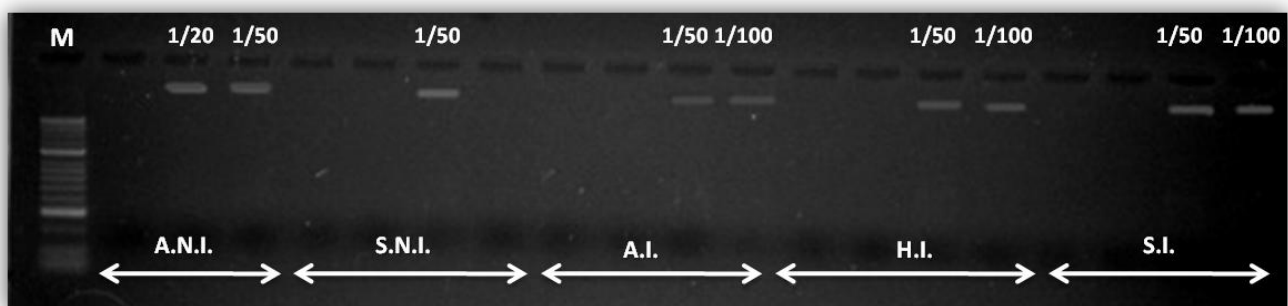


Figura 8 – Quantificação de DNA de *B. glabrata* - A.N.I. albino não infectado, S.N.I. selvagem não infectado, A.I. albino infectado, H.I. híbrido infectado, S.I. selvagem infectado; M – Marcador de peso molecular (HypperLadder, 1000pb)

4.2.2 Identificação de polimorfismos

No presente trabalho, avaliou-se a variação genética das duas estirpes de *B. glabrata*. Foram utilizados arbitrariamente seis *primers*, mas apenas dois apresentaram resultados consistentes e reprodutíveis – Seq. 20 e Seq. 21. Na **Tabela 1** estão descritos os *primers* utilizados.

4.2.2.1 Diferenças genéticas entre estirpes

Na **Figura 9** mostram-se os resultados correspondentes à amplificação do DNA genómico dos moluscos infectados de ambas as estirpes. Pode-se constatar a presença de duas bandas comuns em ambas as estirpes, uma com 500pb e outra de 300pb, com a utilização do *primer* Seq. 20. Observa-se também a presença de bandas com 800pb, 700pb, 550pb e 100pb presentes apenas nos albinos infectados. Por outro lado, nos moluscos da estirpe selvagem verifica-se a existência de três bandas específicas com 900pb, 650pb e 600pb.

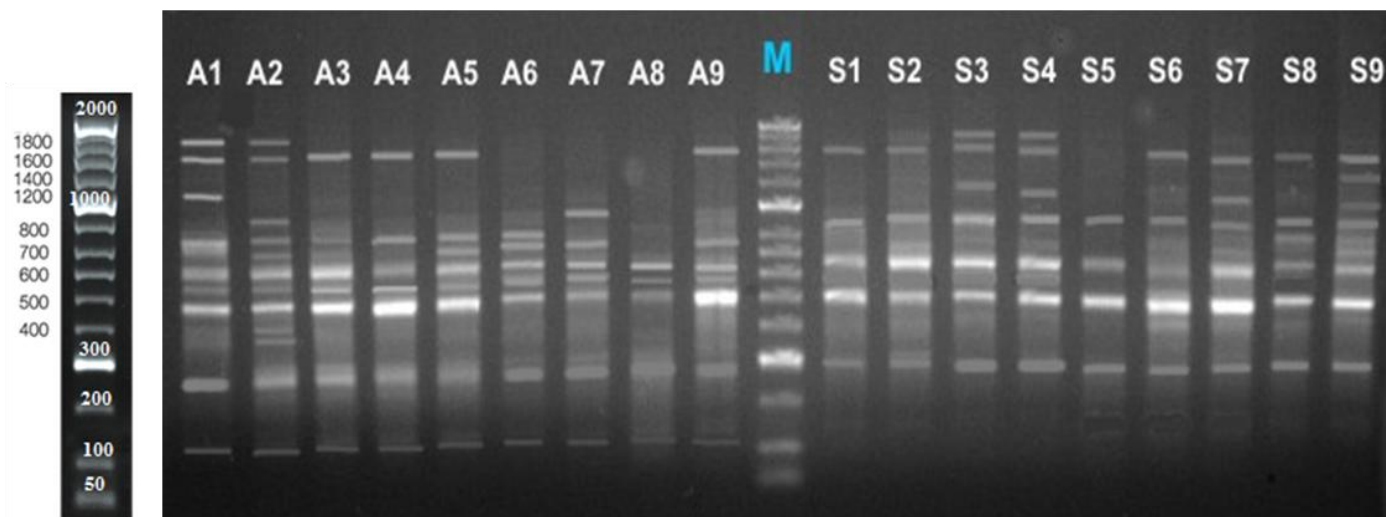


Figura 9 – Amplificação do DNA de moluscos *B. glabrata*, da estirpe albina, infectados (A1-A9) e da estirpe selvagem, infectados (S1-S9) com o *primer* Seq. 20; M – Marcador de peso molecular (Hyper Ladder 2000pb)

Quando se comparam os moluscos da estirpe albina infectada com selvagens infectados em que se utilizou o *primer* Seq. 21, observa-se um maior número de bandas, mas também uma maior semelhança entre si, quando comparados com o *primer* Seq. 20, nas mesmas condições (**Figura 10**).

Verificou-se a existência de quatro bandas presentes quer em moluscos albinos quer em selvagens infectados, com os seguintes pesos moleculares: 700pb, 600pb, 400pb e 300pb. Nos moluscos albinos destacam-se duas bandas específicas, com 500pb e 200pb, respectivamente. Nos selvagens apenas os marcadores com 1200pb e 500pb são específicos desta estirpe.

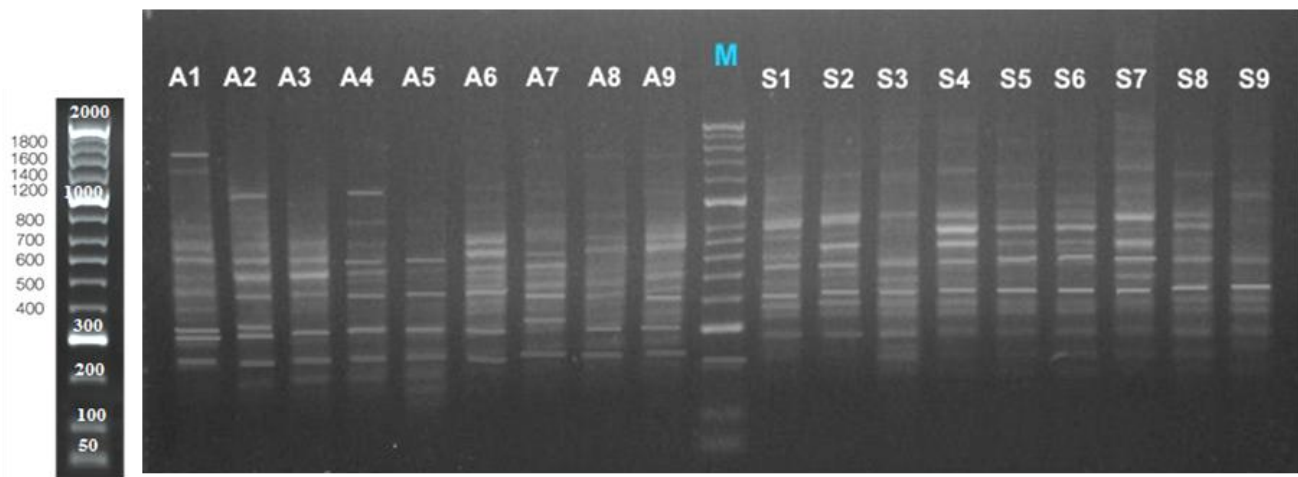


Figura 10 - Amplificação do DNA de moluscos *B. glabrata*, da estirpe albina, infectados (A1-A9) e da estirpe selvagem, infectados (S1-S9) com o *primer* Seq. 21; M – Marcador de peso molecular (HyperLadder, 2000pb)

Quando são utilizados estes dois *primers* para a comparação entre moluscos albinos e selvagens que não foram expostos à infecção, os resultados diferenciam-se (**Figura 11**).

Com o *primer* Seq. 20 obtiveram-se quatro bandas comuns, em ambas as estirpes, de 700pb, 600pb, 500pb e 300pb. Especificamente os marcadores com 1800pb e 1000pb correspondem à estirpe albina e selvagem não infectados, respectivamente.

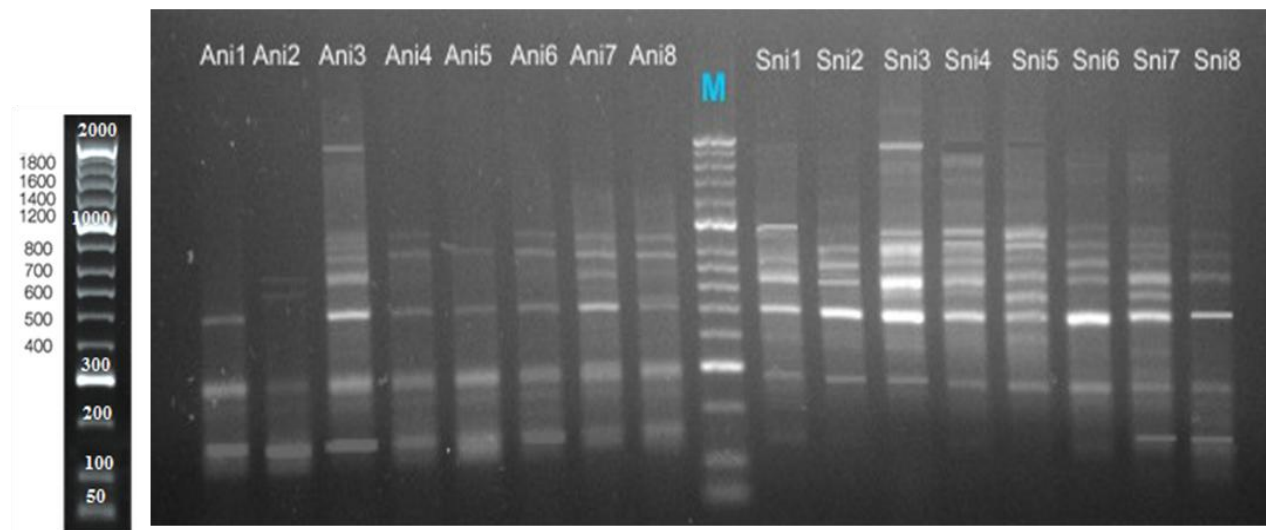


Figura 11 - Amplificação do DNA de moluscos *B. glabrata*, da estirpe albina, não infectados (Ani1-Ani8) e da estirpe selvagem, não infectados (Sni1-Sni8) com o *primer* Seq. 20; M – Marcador de peso molecular (HypperLadder, 2000pb)

Relativamente ao *primer* Seq. 21 também se observou a existência de quatro bandas comuns às estirpes, com 400pb, 280pb, 220pb e 180pb. Quanto a marcadores específicos, com este *primer* obteve-se sete para os moluscos selvagens não infectados – 1600pb, 1200pb, 800pb, 700pb, 600pb, 500pb e 350pb – e dois para os albinos não infectados, ambas com 120pb e 90pb.

Na **Tabela 7** estão descritos os resultados obtidos no estudo da similaridade expressa pelo Coeficiente de Dice (**S**). Observa-se para os dois *primers* em estudo nos moluscos das duas estirpes, a existência de uma heterogeneidade genética, com valores que oscilam entre 0,4 e 0,7 para os moluscos infectados e não infectados.

Tabela 7 - Coeficiente de Dice aplicado à diferença genética entre estirpes

	Primer Seq. 20		Primer Seq. 21	
	A.I. / S.I.	A.N.I. / S.N.I	A.I. / S.I.	A.N.I. / S.N.I
Nº de bandas existentes nos Selvagens	5	5	6	11
Nº de bandas existentes nos Albinos	6	5	7	5
Nº de bandas em ambas estirpes(a)	2	4	4	4
Nº de bandas existentes só nos Albinos (b)	4	1	2	2
Nº de bandas existentes só nos Selvagens (c)	3	1	2	7
Coef. de Similariedade (S)	0,4	0,4	0,7	0,5

4.2.2.1 Diferenças genéticas entre os moluscos infectados e não infectados

Dentro de mesma estirpe foram comparados moluscos expostos com os moluscos não expostos à infecção. Foram utilizados os mesmos dois *primers* já descritos anteriormente.

Nas **Figuras 12** e **13** observam-se três bandas de 700pb, 500pb e 300pb, respectivamente, e que estão presentes nos moluscos infectados e não infectados. Por outro lado, só nos moluscos albinos infectados é que são observadas duas bandas específicas, 900pb e 150pb, enquanto nos albinos não infectados observam-se duas bandas específicas de 550pb e 100pb, respectivamente.

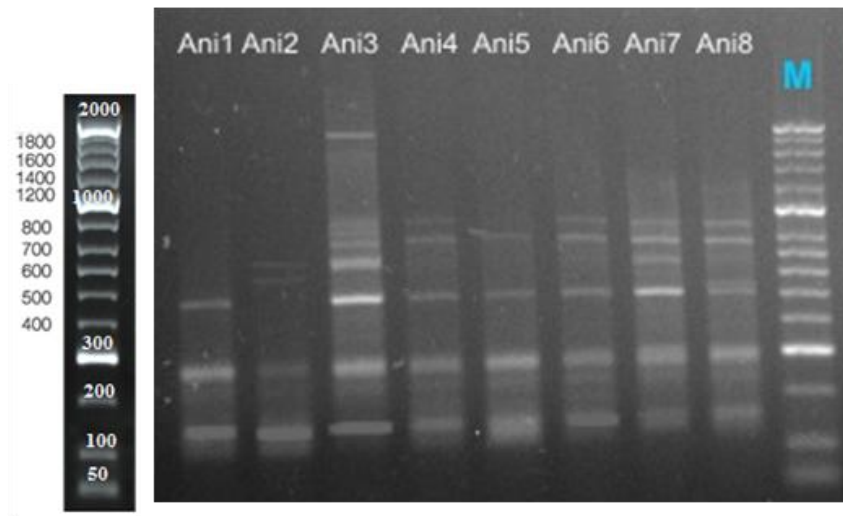


Figura 12 - Amplificação do DNA de moluscos *B. glabrata*, da estirpe albina, não infectados (Ani1-Ani8) com o *primer* Seq. 20; M – Marcador de peso molecular (HypperLadder, 2000pb)

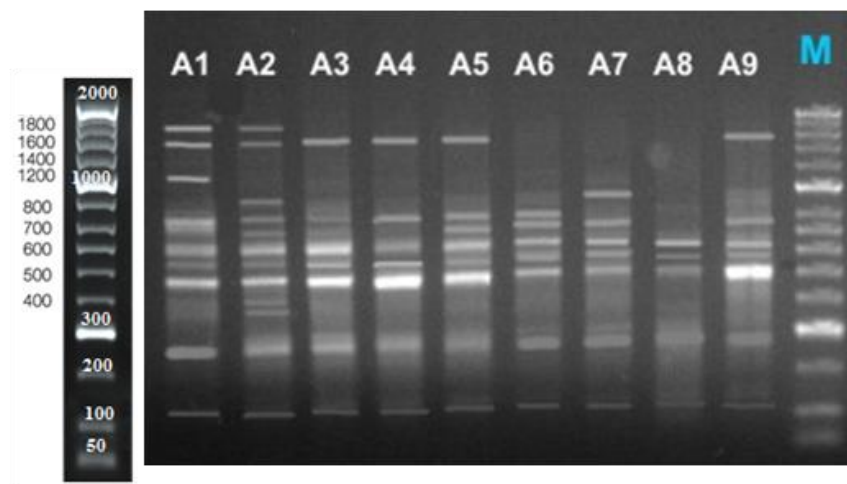


Figura 13 - Amplificação do DNA de moluscos de *B. glabrata*, da estirpe albina, infectados (A1-A9) com o *primer* seq. 20; M – Marcador de peso molecular (HypperLadder, 2000pb)

Quatro bandas, com 900pb, 600pb, 500pb e 300pb, estão presentes nos moluscos selvagens infectados e não infectados. Apenas uma banda com 650pb é específica para infectados e outra com 700pb para os não infectados (**Figuras 14 e 15**).

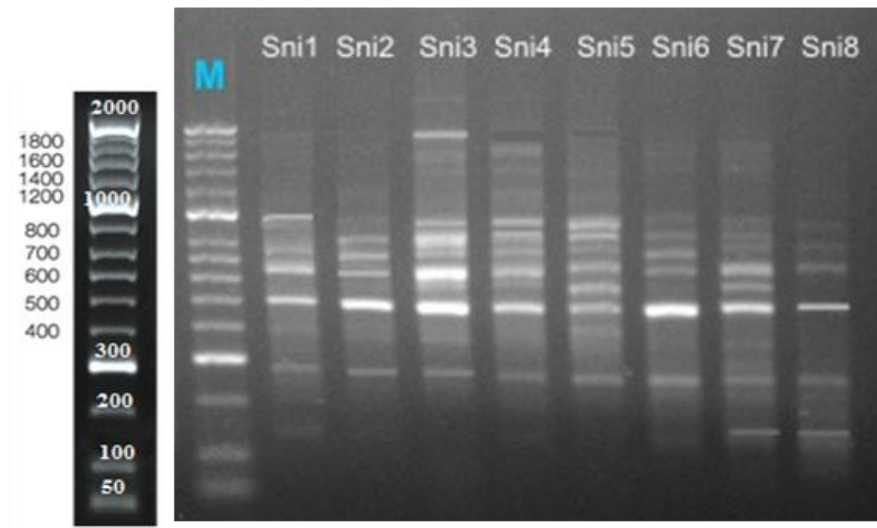


Figura 14 - Amplificação do DNA de moluscos *B. glabrata*, da estirpe selvagem, não infectados (Sni1-Sni8) com o *primer* Seq. 20; M – Marcador de peso molecular (HypperLadder, 2000pb)

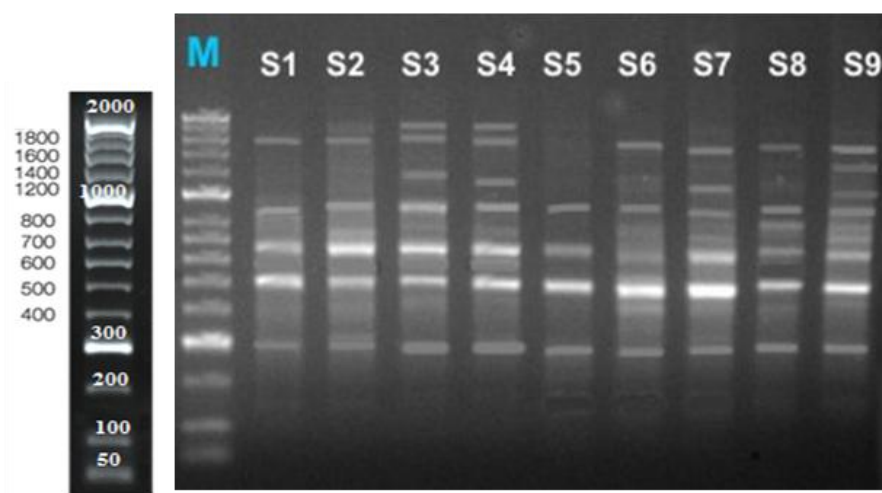


Figura 15 - Amplificação do DNA de moluscos *B. glabrata*, da estirpe selvagem, infectados (S1-S9) com o *primer* Seq. 20; M – Marcador de peso molecular (HypperLadder, 2000pb)

Na amplificação com o *primer* Seq. 21 obteve-se uma banda comum nos albinos infectados e não infectados, com 400pb. Seis bandas específicas foram encontradas para os moluscos albinos infectados (**Figura 16**) com 800pb, 700pb, 600pb, 500pb, 300pb e 200pb e quatro bandas específicas para os não infectados – 220pb, 180pb, 120pb, e 90pb (**Figura 17**).

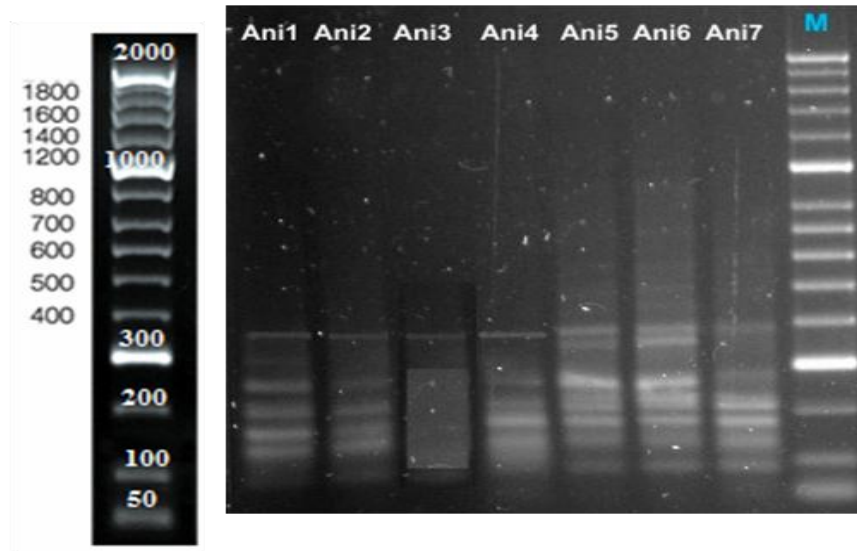


Figura 16 - Amplificação do DNA de moluscos *B. glabrata*, da estirpe albina, não infectados (Ani1-Ani7) com o *primer* Seq. 21; M – Marcador de peso molecular (HypperLadder, 2000pb)

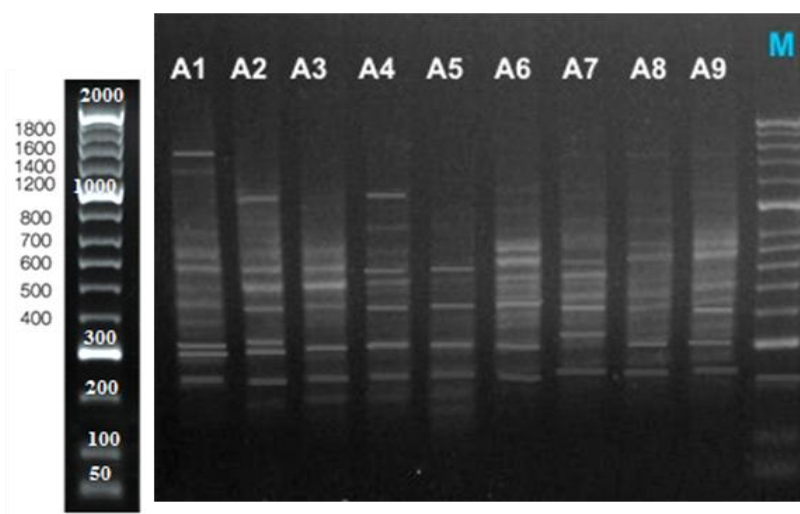


Figura 17 - Amplificação do DNA de moluscos *B. glabrata*, da estirpe albina, infectados (A1-A9) com o *primer* Seq. 21; M – Marcador de peso molecular (HypperLadder, 2000pb)

Nos moluscos da estirpe selvagem observam-se quatro bandas comuns, quer em infectados quer em não infectados, com 1200pb, 800pb, 600pb e 400pb. Nos selvagens não infectados identificam-se sete marcadores específicos dos 900pb, 850pb, 500pb, 350pb, 280pb, 220pb e 180pb (**Figura 18**). Obtiveram-se também duas bandas específicas nos moluscos selvagens infectados com 550pb e 300pb (**Figura 19**).

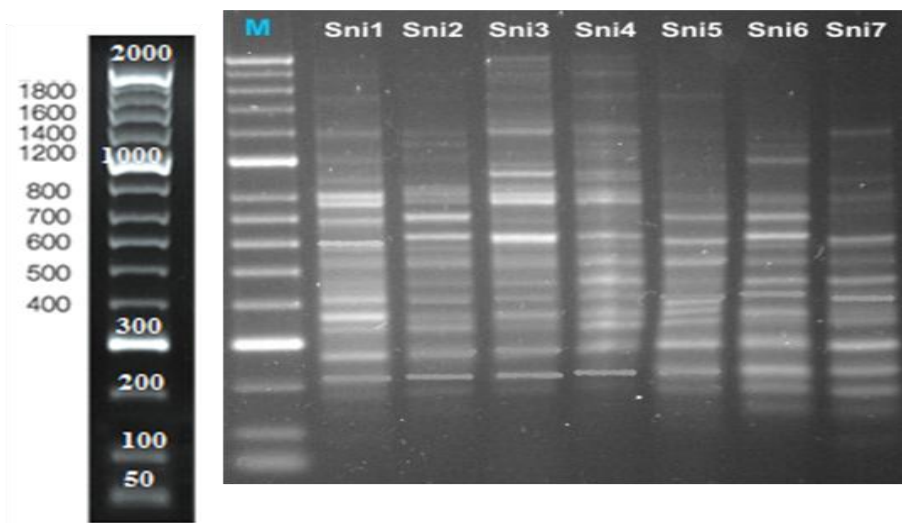


Figura 18 - Amplificação do DNA de moluscos *B. glabrata*, da estirpe selvagem, não infectados (Sni1-Sni7) com o *primer* Seq. 21; M – Marcador de peso molecular (HypperLadder, 2000pb)

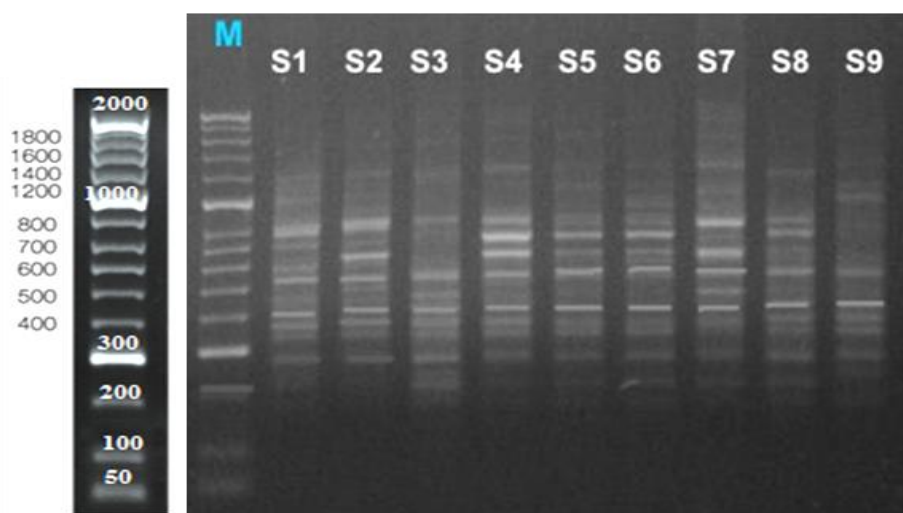


Figura 19 - Amplificação do DNA de moluscos *B. glabrata*, da estirpe selvagem, infectados (S1-S9) com o *primer* seq. 21; M – Marcador de peso molecular (HypperLadder, 2000pb)

Na **Tabela 8** está descrito o Coeficiente de Similaridade (**S**) entre os perfis das bandas dos moluscos infectados e não infectados de ambas as estirpes e em que se observa uma maior variação com o *primer* Seq. 21 do que com o *primer* Seq. 20.

Tabela 8 - Coeficiente de Dice aplicado à diferença genética de estados de infecção

	Primer Seq. 20		Primer Seq. 21	
	A.I. / A.N.I.	S.I. / S.N.I	A.I. / A.N.I.	S.I. / S.N.I
Nº de bandas existentes nos Infectados	6	5	7	6
Nº de bandas existentes nos Não Infectados	5	5	5	8
Nº de bandas em ambos os estados (a)	3	4	1	4
Nº de bandas existentes só nos Infectados (b)	3	2	6	1
Nº de bandas existentes só nos Não Infectados (c)	2	2	4	6
Coef. de Similariedade (S)	0,5	0,5	0,2	0,5

Capítulo V – Discussão

5.1 Comparação da susceptibilidade das estirpes albina e selvagem de *B. glabrata*

Segundo Paraense e Corrêa (1963), a variação da susceptibilidade seria um aspecto da variabilidade intraespecífica do molusco e o grau de susceptibilidade dependeria da frequência relativa dos genótipos resistentes e susceptíveis em cada população. Nos anos 60 do século XX, estes dados foram comprovados por Newton (1962) ao esclarecer que a susceptibilidade apresentava um carácter hereditário e que entre as estirpes de *B. glabrata*, o fenótipo albino era o que apresentava ser o mais susceptível.

Estes resultados parecem corroborar os resultados por nós obtidos. A taxa de susceptibilidade da estirpe albina foi mais elevada do que a taxa da estirpe selvagem, durante as doze semanas em que decorreu o presente estudo. Quanto à taxa de mortalidade, esta foi também mais elevada na estirpe albina do que na estirpe selvagem (**Tabela 4**).

O período pré-patente foi igual para as duas estirpes, tendo ambas iniciado a eliminação de cercárias a partir da 5ª semana. Contudo, no período patente, os albinos apresentaram ser mais susceptíveis, isto é, foram os que eliminaram um maior número de cercárias. Janotti-Passos & Souza (2000) defendem que moluscos pouco susceptíveis eliminam cercárias tardiamente, o que resultaria num período pré-patente mais longo.

Por outro lado, Lewis *et al.* (1993) defendem que muitas das variadas interações hospedeiro-parasita ocorrem com diferentes combinações entre as populações de *B. glabrata* e *S. mansoni*. Algumas dessas combinações genéticas ajudam o parasita a desenvolver-se e proliferar, porque o molusco não o reconhece como um corpo estranho. Contudo, noutras combinações o parasita é reconhecido e rapidamente encapsulado pelos hemócitos e fagocitados em poucos dias (Loker *et al.*, 1982 e Richards *et al.*, 1992). Porém, este facto não se verifica nos moluscos da estirpe selvagem, em que o número de moluscos positivos triplicou da 5ª para a 6ª semana. Outros

investigadores (Richards & Merrit, 1972 e Richards, 1973) sugeriram que as variações nos padrões de pigmentação no manto dos moluscos são geneticamente determinadas e poderiam influenciar a susceptibilidade ao *S. mansoni*, levando a pensar que os moluscos albinos pudessem ser mais susceptíveis que os moluscos selvagens. Verificou-se, através de vários cruzamentos entre moluscos refractários e susceptíveis e através da auto-fecundação, que a susceptibilidade e a refractividade à infecção decorrem de uma grande variabilidade de genes, sendo independentes da pigmentação do manto.

Allegretti *et al.* (2009) estudaram a influência da pigmentação e a resposta imune de moluscos selvagens e albinos da espécie *B. glabrata* de Belo Horizonte (Minas Gerais, Brasil), envolvendo amebócitos face à infecção por *S. mansoni*. Os resultados por eles obtidos sugeriram que a estirpe selvagem era mais susceptível que a estirpe albina. A variante selvagem de *B. glabrata* apresentou maior taxa de mortalidade, de infecção e menor número de amebócitos circulantes, demonstrando um sistema de combate à infecção menos eficiente.

No nosso estudo os resultados e as deduções foram um pouco diferentes. Dados como a mortalidade, a taxa de infecção, inclusive o maior número de cercárias e duração de períodos de infecção (pré-patente e patente), mostraram valores mais elevados na estirpe albina, mesmo quando exposta a igual número de miracídios. Os resultados por nós obtidos poderão ser justificados com base na pigmentação, hipótese testada e não comprovada, anteriormente, por outros investigadores (Richards & Merrit, 1972 e Richards, 1973).

Outros factores podem estar na origem desta diferença de resultados, nomeadamente o tempo de manutenção da espécie em laboratório, a influência das sucessivas gerações, as origens das estirpes tal como as linhagens do próprio parasita, pois, como foi referido inicialmente neste capítulo, a susceptibilidade possui diversos graus dentro de uma mesma população.

5.2 Comparação genética de polimorfismos da estirpe albina e selvagem de *B. glabrata*

Apesar do número de oligonucleótidos utilizados neste estudo não terem sido elevados, a técnica molecular RAPD-PCR revelou ser um meio adequado para analisar a variação genética entre as duas estirpes de *B. glabrata* quando expostas a *S. mansoni*.

Vidigal *et al.* (1994), usando a técnica de RAPD-PCR, mostraram que o genoma de *B. glabrata* exibe um polimorfismo intra-específico expressivo entre diferentes populações naturais destes moluscos. Segundo os autores, os moluscos que ocupam no Brasil as mesmas regiões geográficas, parecem ser geneticamente homogêneas.

Em estudos anteriores, em que foram utilizadas isoenzimas (Mulvey & Vrijenhoek, 1981) assim como a análise de polimorfismos por RFLP (Knight *et al.*, 1991 e Mulvey & Bandoni, 1994), os autores sugeriram que as populações de *B. glabrata* mantidas em laboratório durante várias gerações, apresentavam um grau significativo de variabilidade genética.

O nosso estudo demonstra que, embora os moluscos utilizados fossem de duas estirpes de *B. glabrata*, mantidas em laboratório há vários anos, não constituem um grupo genético homogêneo.

A análise da variabilidade genética relacionada com a susceptibilidade à infecção por *S. mansoni* é extremamente importante, pois possibilita uma maior compreensão da sua epidemiologia e ainda a formulação de novas estratégias e métodos para controlo da doença (Spada *et al.*, 2002).

O recurso à técnica de RAPD-PCR demonstrou grande aplicabilidade, e deste modo tem sido usada para investigar a variação populacional relacionada com susceptibilidade e resistência de *B. glabrata* a *S. mansoni* (Oliveira *et al.*, 2008). Também Langand *et al.* (1993) demonstraram que a técnica de RAPD-PCR, por si só, é uma boa ferramenta para medir o grau de diversidade genética entre os moluscos do género *Bulinus*.

Neste estudo ficou demonstrada a utilidade da técnica de RAPD-PCR, como método de diferenciação de variantes de *B. glabrata* expostas à infecção por *S. mansoni*. A identificação de bandas polimórficas baseou-se na comparação do padrão de bandas, de ambas as estirpes num gel de agarose. As bandas ou padrão de bandas detectadas em todos os indivíduos são consideradas como polimórficas (Larson *et al.*, 1996). Foram utilizados seis *primers* aleatoriamente, mas apenas dois apresentaram bandas reprodutivas em todas as etapas do nosso estudo.

Segundo Guaraldo *et al.* (1981), o ajuste fisiológico entre o molusco e o parasita é um factor decisivo para o sucesso do parasitismo durante o processo de infecção. Os efeitos desta relação durante o processo muito íntimo seriam determinados por um mecanismo complexo de interacção parasita-hospedeiro que era controlado pela constituição genética de cada espécie envolvida.

Comparando os moluscos albinos e selvagens expostos aos miracídeos com a aplicação do *primer* Seq. 20, observou-se a existência de duas bandas comuns de 300pb e 500pb. Este resultado corresponde a uma similaridade (S) de 0,4 (**Tabela 7**), comprovando uma variação genética significativa. Esta variação entre estirpes veio sendo observada ao longo de todo o estudo.

De facto, embora se trate de uma espécie susceptível, e como este factor tem uma componente genética, já se esperava uma diferença na composição genética das duas estirpes. No entanto, quando é aplicado o *primer* Seq. 21, a similaridade (S) apresenta valores na ordem de 0,7 (**Tabela 7**), o que sugere uma maior proximidade das estirpes.

Os resultados mostraram que a técnica de RAPD pode ser uma ferramenta fácil e rápida na detecção de diferenças genéticas entre estirpes de *B. glabrata* mantidas em laboratório.

Vidigal *et al.* (1994) demonstraram que a heterogeneidade genética de *B. glabrata* é elevada e que a grande variedade de marcadores genéticos polimórficos indicam que a análise de RAPD pode ser uma importante contribuição para os estudos genéticos de *Biomphalaria*.

Marcadores ou sequências genômicas associadas com a resistência à infecção poderão ser, por si só, uma oportunidade para a produção de moluscos transgênicos e refractários, os quais, em conjunto com outras medidas, poderiam levar à elaboração de estratégias de controle da Schistosomose.

Capítulo VI – Conclusões

6. Conclusões

O presente trabalho procurou ser um contributo para o estudo da variação genética de duas estirpes de *B. glabrata* mantidas em laboratório.

Dos resultados obtidos, podemos concluir que:

- A mortalidade é superior na estirpe albina, quer em períodos de pré exposição quer em períodos de pós exposição, a miracídeos de *S. mansoni*, em relação à estirpe selvagem nas mesmas condições;
- A taxa de infecção ao longo das semanas é superior na estirpe albina em relação à estirpe selvagem;
- A média de libertação de cercárias é superior na estirpe albina ao longo das 12 semanas de estudo, indicando uma maior susceptibilidade desta mesma estirpe;
- A taxa de variação genética entre as duas estirpes é elevada.

Capítulo VII – Referências Bibliográficas

7. Referências Bibliográficas

- ABDEL-HAMID, A. H. Z., MOLFETTA, J. B., FERNANDEZ, V., & RODRIGUES, V., 1999. Genetic variation between susceptible and non-susceptible snails to *Schistosoma* infection using Random Amplified Polymorphic DNA analysis (RAPDs). *Rev. Inst. Med. Trop.*, **41** (5): 291-195.
- ABDEL-HAMID, A. H. Z., RAWI, S. M. & ARAFA, A. F., 2006. Identification of a genetic marker associated with the resistance to *Schistosoma mansoni* infection using Random Amplified Polymorphic DNA analysis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **101** (8): 863-868.
- ADEMA, C. M. & LOKER, E. S., 1977. Specificity and immunobiology of larval digenean-snail associations. In *Advances in Trematode Biology*, Eds Fried B, Graczyk TK, CRC Press, pp. 230-263.
- ALLEGRETTI, S. M., CARVALHO, J. F., MAGALHÃES, L. A. & ZANOTTI-MAGALHÃES, E. M., 2009. Behaviour of albino and melanic variants of *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (Mollusca: Planorbidae) following infection by *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907. *Braz. J. Biol.*, **69** (1): 217-219.
- BAKER, F. C., 1945. The Molluscan Family *Planorbidae*. *Univ. Illinois Press*. Urbana, Illinois, pp. 530
- BANAJA, A. E., JAMJOOM, M. B., SHALABY, I. M. & GHERBAWY, Y. A., 2008. Discrimination between susceptible and non-susceptible *Biomphalaria alexandrina* snails – intermediate hosts of *Schistosoma mansoni* in Western Saudi Arabia – using Random Amplified Polymorphic DNA analysis. *Belg. J. Zool.*, **138** (2): 191-195.
- BANDONI, S. M., MULVEY, M. & LOKER, E. S., 1995. Intraspecific and interspecific patterns of allozyme variation among species of *Biomphalaria* Preston, 1910 (Gastropoda: Planorbidae). *Biochem. Syst. Ecol.*, **23**: 593-616.

- BARBOSA, F. S. & OLIVIER, L., 1958. Studies on the snail vectors of Bilharziasis mansoni North-Eastern Brazil. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, **18**: 895-908.
- BORGES, C. M., DE SOUZA, C. P. & ANDRADE, Z. A., 1998. Histopathologic features associated with susceptibility and resistance of *Biomphalaria* snails to infection with *Schistosoma mansoni*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **93** (Suppl. I): 117-121.
- BROWN, D. S., 1980. *Freshwater snails of Africa and their importance*. Taylor & Francis, London, pp. 487.
- BRUMPT, E., 1940. Confirmation des observation de A. Lutz sur les lesions tentaculaires de *Planorbis glabratus* (= *Planorbis guadaloupensis*) déterminées par l'évaluation sur place des miracidies de *Schistosoma mansoni*. *C. R. Soc. Biol*, **133** (4): 625-628.
- BRUMPT, E., 1941. Observations Biologiques diverses concernant. *Planorbis (Australorbis) glabratus* hôte-intermediaire de *Schistosoma mansoni*. *Am. Parasitol. Humaine Corp.*, **18** (1-3): 4-45.
- CALDEIRA, R. L., 1999. *Identificação molecular e análise da variabilidade genética dos moluscos do complexo Biomphalaria straminea através das técnicas de PCR-RFLP e SSR-PCR* Tese apresentada a Fundação Oswaldo Cruz. *Instituto Oswaldo Cruz*. Rio de Janeiro, pp. 66.
- CALDEIRA, R. L., VIDIGAL, T. H. D. A, MATINELLA, L., SIMPSON, A. J. G. & CARVALHO, O. S., 2000. Identification of Planorbids from Venezuela by Polymerase Chain Reaction Amplification and Restriction Length Polymorphism of Internal transcriber Spacer of the RNA ribosomal gene. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **95** (2): 171-177.
- CALDEIRA, R. L., VIDIGAL, T. H. D. A, PAULINELLI, S. T., SIMPSON, A. J. G. & CARVALHO, O. S., 1998. Molecular Identification of Similar Species of the Genus *Biomphalaria* (Mollusca: Planorbidae) Determined by a Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **93**: 219-225.

- CARVALHO, O.S., CALDEIRA, R. L., SIMPSON, A. J. & VIDIGAL, T.H.D.A., 2001. Genetic variability and molecular identification of Brazilian *Biomphalaria* species (Mollusca: Planorbidae). *Parasitology*, **123**: 197-209.
- COELHO, M. V., 1954. Acção das formas larvárias de *Schistosoma mansoni* sobre a reprodução de *Australorbis glabratus*. *Pub. Av. Inst. Aggeu Magalhães*, **3** (3): 39-54
- COELHO, P. M., CARVALHO, O. S., ANDRADE, Z. A., MARTINS-SOUSA, R. L., ROSA, F. M., BARBOSA, L., PEREIRA, C. A., CALDEIRA, R. L., JANNOTTI-PASSOS, L. K., GODARD A. L., MOREIRA, L. A., OLIVEIRA, G. C., FRANCO, G. R., TELES, H. M. & NEGRÃO-CORRÊA, D., 2004. *Biomphalaria tenagophila/Schistosoma mansoni* interaction: premises for a new approach to biological control of Schistosomiasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **99** (5): 109-111.
- DESCHIENS, R., 1954. Incidence de la mineralization de l'eau sur les mollusques vecteurs des Bilharzioses: Consequences pratiques. *Bull. Soc. Path. Exo.*, **47**: 915-929.
- DICE, L. R., 1945. Measures of the amount of ecological association between species. *Ecology*, **26**: 297-302.
- DUVALL, R. H. & DEWITT, W. B., 1967. An improved perfusion technique for recovering adult *Schistosoma* from laboratory animals. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **16**: 483-486.
- FRAGA DE AZEVEDO, J. & MEDEIROS, L. C. M., 1955. Estudos, ensaios e documentos. XIV. Moluscos de água doce do Ultramar Português I. Introdução: Generalidades. *Junta de Investigação do Ultramar*, Lisboa, pp. 95.
- GIBODAT, M. & BERGQUIST, N. R., 2000. Post-transmission Schistosomiasis: a new agenda. *Acta Tropica*, **77**: 3-7.

- GUARALDO, A. M. A., MAGALHÃES, L.A., RANGEL, H. A. & PAREJA, G., 1981. Evolução dos esporocistos de *Schistosoma mansoni*, Sambon 1907, em *Biomphalaria glabrata* (Say, 1918) e *Biomphalaria tenagophila* (D'Orbigny, 1835). *Rev. Saúde Pública*, **15** (4): 436-448.
- GUERREIRO, M. G. R. S., 1993. *Gênero: Biomphalaria*. IHMT, UHMM, Lisboa, pp. 125
- GUIMARÃES, C. T., SOARES, D. M., ANDRADE, Z. A. & SOUZA, C. P., 1997. Resistência de *Biomphalaria glabrata* à infecção pelo *Schistosoma mansoni*: variações no período pré-patente e na compatibilidade. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **30** (4): 273-278.
- GRÁCIO, M. A. A., 1981. A importância da malacologia em Parasitologia médica com breve nota sobre os Gastropoda de água doce em Portugal. *Sep. Jornal de Soc. Ciências Médicas*, **CXLV** (2): 119-140.
- HAGGAG, S. H. & EL-SHERBIRTY, M., 2006. Molecular markers associated with resistance to *Schistosoma mansoni*, infection in the *Biomphalaria glabrata*. *Biotechnology*, **5** (4): 401-412.
- JANOTTI-PASSOS, L. K, SOUZA & C. P., 2000. Susceptibility of *Biomphalaria tenagophila* and *Biomphalaria straminea* to *Schistosoma mansoni* infection detected by low stringency polymerase chain reaction. *Rev. Ins. Med. Trop.*, **42** (5): 291-294.
- JONES, C. S., LOCKYER, A. E., ROLLINSON, D. & NOBLE, L. R., 2001. Molecular approaches in the study of *Biomphalaria glabrata* - *Schistosoma mansoni* interactions: linkage analysis and gene expression profiling. *Parasitology*, **123**: 181-196.
- KAWAZOE, U., 1976. Alguns aspectos da biologia da *Biomphalaria glabrata* (Say 1818) e *Biomphalaria tenagophila* (D'Orbigny, 1835) I. Duração do período embrionário. *Rev. Saud. Publ.*, **10**: 57-64.

- KLOOS, H. & DAVID, R., 2002. The paleoepidemiology of Schistosomiasis in ancient Egypt. *Human Ecology Review*, **9** (1): 14-25.
- KNIGHT, M., BRINDLEY, P. J., RICHARDS, C. S. & LEWIS, F.A., 1991. *Schistosoma mansoni*: use of a cloned ribosomal RNA gene probe to detect restriction fragment length polymorphisms in the intermediate host of *Biomphalaria glabrata*. *Exp Parasitol*, **73**: 285-294.
- KNIGHT, M., ONGELE, E. & LEWIS, F. A., 2000. Molecular studies of *Biomphalaria glabrata*, an intermediate host of *Schistosoma mansoni*. *International Journal for Parasitology*, **30**: 535 – 541.
- LACERDA, D. R., MACEDO, M. D. P., LEMOS FILHO, J. P. & LOVATO, M. B., 2002. A técnica de RAPD: uma ferramenta molecular em estudos de conservação das plantas. *Lundiana*, **3** (2): 87-89.
- LAGAND, J., BARRAL, V., DELAY, B. & JOURDANE, J., 1993. Detection of genetic diversity within snail intermediate hosts of the genus *Bulinus* by using Random amplified polymorphic DNA (markers). *Acta Tropica*, **55**: 205-215.
- LAGRANGE, E., 1957. Fécondité et régime chez *Planorbis glabratus*. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, **50** (5): 808-811.
- LARSON, S. E., ANDERSEN, P. L., MILLER, A. N., COUSIN, C. E., RICHARDS, C. S., LEWIS, F. A. & KIGNHT, M., 1996. Use of RAPD-PCR to differentiate genetically defined lines of an intermediate host of *Schistosoma mansoni*, *Biomphalaria glabrata*. *Journal of Parasitology*, **82**: 237-244.
- LEWIS, F. A., KNIGHT, M. & RICHARDS, C. S., 1997. A laboratory based approach to biological control of snail. *Mem. Inst. Osw. Cruz*, **92**: 661-662.

- LEWIS, F. A., RICHARDS, C. S., KNIGHT, M., COOPER, L. A. & CLARK, B., 1993. *Schistosoma mansoni*: analysis of an unusual infection phenotype in the intermediate host snail *Biomphalaria glabrata*. *Exp. Parasit.*, **77**: 349-361.
- LOCKER, E. S., BAYNE, C. J., Buckley, P. M. & Kruse, K. T., 1982. Ultrastructure of encapsulation of *Schistosoma mansoni* mother sporocysts by hemocytes of juveniles of the 10-R2 strain of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Gastropoda). *Journal of Parasitology*, **68**: 84-94.
- LUTZ, A., 1919. *Schistosomum mansoni* and schistosomiasis observed in Brazil. *Mem. Inst. Osw. Cruz*, **11** (1): 109-140.
- MALEK, E. T. A., 1958. Factors conditioning the habitat of Bilharziasis in intermediate hosts of the Family *Planorbidae*. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, **18**: 785-818.
- MALEK, E. T. A., 1980. *Snail-transmitted parasite diseases*. Vol. I, CRC Press, pp. 177.
- MALEK, E. T. A. & CHENG, T. A., 1974. *Medical and Economic Malacology*. Academic Press, pp. 334.
- MOREL, C., 2000. Editorial, *Acta Tropica*, **77** (1): 3-7.
- MORGAN J. A., DEJONG R. J., SNYDER S. D., MKOJI G. M. & LOCKER. E. S., 2001. *Schistosoma mansoni* and *Biomphalaria*: past history and future trends. *Parasitology*, **123** (7): 211-228.
- MULVEY, M. & BANDONI, S. M., 1994. Genetic variability in the M-line stock of *Biomphalaria glabrata*. *J. Helminthol. Soc. Washington*, **61**: 103-108.
- MULVEY, M. & VRIJENHOEK, R. C., 1981. Genetic variation among laboratory strains of the planorbid snail *Biomphalaria glabrata*. *Biochem. Gen.*, **19**: 1169-1181.

- NEWTON, W. L., 1953. The inheritance of susceptibility to infection with *Schistosoma mansoni* of *Australorbis glabratus*. *Exp. Parasitol*, **2** (3): 242-257.
- NEWTON, W. L., 1955. The establishment of a strain of *Australorbis glabratus* which compares albinism and high susceptibility to infection with *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.*, **40**: 352-355.
- NEWTON, W. L., 1962. The comparative tissue reaction of two strains *Australorbis glabrata* to infection with *Schistosoma mansoni*. *The Journal of Parasitology*, **38**: 362-370.
- OLIVEIRA, A.L.D., DA SILVA, D., ZANOTTI-MAGALHÃES, E.M., ABDEL-HAMID, A.Z. & RIBEIRO-PAES, J. T., 2008. *Schistosome/mollusk*: genetic compatibility. *Genetics and Molecular Research.*, **7** (2): 518-526.
- OLIVEIRA, A. L. D., 2006. *Estudo biológico e molecular em cepas de Biomphalaria tenagophila resistentes e suscetíveis à infecção por Schistosoma mansoni*. Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia. USP/Instituto Butantan/IPT. São Paulo, Brasil. pp. 114.
- PAN, C. T., 1965. Studies on the host-parasite relationship between *Schistosoma mansoni* and the snail *Australorbis glabratus*. *Am. J. Trp. Med. Hyg.*, **14**(6): 931-976.
- PARAENSE, W. L., 1955. Autofecundação e fecundação cruzada em *Australorbis glabratus*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **53**: 277-284.
- PARAENSE, W. L., 1975. Estado atual da sistemática dos planorbídeos brasileiros. *Arq. Mus. Nac.*, **55**: 105-128.
- PARAENSE, W. L. & CORRÊA, L.R., 1963. Susceptibility of *Australorbis tenagophila* with *Schistosoma mansoni*. *Rev. Inst. Med. Trop.*, **5**: 23-29.

- PAZ, R. J. *Biologia e Ecologia de Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Mollusca: Pulmonata: Planorbidae), na Fazenda Árvore Alta, Alhandra (Paraíba: Brasil). 1997. Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Universidade Federal de Paraíba. Centro de Ciências Exatas e da Natureza. Paraíba, Brasil, pp. 134.
- PEPE, M. S., 1996. *Identificação de populações de Biomphalaria* (Gastropoda: Planorbidae) na região sul do Rio Grande do Sul, Brasil. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia. Universidade Federal de Pelotas. Brasil, pp. 79.
- PIMENTEL, D., 1957. Life history of *Australorbis glabratus*, the intermediate snail host of *Schistosoma mansoni* in Puerto Rico. *Ecol.*, **38** (4): 576-58.
- POINTIER, J. P., 1982. Étude de la croissance de *Biomphalaria glabrata* mollusque hôte intermédiaire de la Schistosomose intestinal dans les forêts merocéane à Ptocarpus de Guadalupe (Antilles Française). *Malacologia*, **22** (1-2): 395-398.
- POINTIER, J. P., 1993. The introduction of *Melanooides tuberculata* (Mollusca: Thiaridae) to the island of Saint Lucia (West Indies) and its role in the decline of *Biomphalaria glabrata*, the snail intermediate host of *Schistosoma mansoni*. *Acta Tropica*, **54** (1): 13-18.
- POINTIER, J. P., DAVID, P., JARNE, P. 2005. Biological invasions: the case of planorbid snails. *Journal of Helminthology*, **79** (3): 249-256.
- REY, LUÍS. *Parasitologia*. 2003. 3ª Edição. Guanabara, pp. 856.
- RICHARDS, C. H. S., 1973. Susceptibility of adult *Biomphalaria glabrata* to *Schistosoma mansoni* infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **22** (6): 748-756.
- RICHARDS, C. H. S., KNIGHT, M. & LEWIS, F. A., 1992. Genetics of *Biomphalaria glabrata* and its effects on the outcome of *Schistosoma mansoni* infection. *Parasitol. Today*, **8** (5): 171-174.

- RICHARDS, C. H. S. & MERRIT, J. W., 1972. Genetic factors in susceptibility of juvenile *Biomphalaria glabrata* to *Schistosoma mansoni* infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **21** (4): 425-434.
- RICHARDS, C. H. S. & SHADE, P. C., 1987. The genetic variation of compatibility in *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.*, **73**: 1146-1151.
- ROLLINSON, D., STOTHARD, J. R., JONES, C. S., LOCKYER, A. E., DE SOUZA, C. P. & NOBLE, L. R., 1998. Molecular characterisation of intermediate snail hosts and the search for resistance genes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **93**: 111 - 116.
- SCHNEIDER, C. R., HIATT R, A., MALEK, E. A. & RUIZ-TIBEN, E., 1985. Assessment of schistosomiasis in the Dominican Republic. *Public Health Reports*, **100** (5): 524–530.
- SIRE, C., LANGAND, J., BARRAL, V. & THÉRON, A., 2001. Parasite (*Schistosoma mansoni*) and host (*Biomphalaria glabrata*) genetic diversity: population structure in a fragmented landscape. *Parasitology*, **122**: 545 - 554.
- SOUZA, C. P., CALDEIRA, R. L., DRUMMOND, S. C., MELO, A. L., GUIMARÃES, C. T., SOARES, D. M. & CARVALHO, O. S., 2001. Geographical Distribution of *Biomphalaria* Snails in the State of Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **96** (3): 293-302.
- SOUZA, C. P., CUNHA, R. C. P. & ANDRADE, Z. A., 1995. Development of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria tenagophila*, *Biomphalaria straminea* and *Biomphalaria glabrata*. *Rev. Ins. Med. Trop.*, **37** (3): 201-206.
- SOUZA, C. P. & JANOTTI-PASSOS, L. K., 2001. Resistance of *Biomphalaria occidentalis* from Várzea das Flores Dam, Minas Gerais, to *Schistosoma* infection detected by low stringency polymerase chain reaction. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **96**: 381-386.

- SPADA, R. G., DA SILVA, D., ABDEL-HAMID, A-H. Z., SOBRAL-HAMAGUCHI, S. S., ZUIM, N. R., ZANOTTI-MAGALHÃES, E. M., MAGALHÃES, L.A. & RIBEIRO-PAES, J.T., 2002. Genetic markers between *Biomphalaria glabrata* snails susceptible and resistant to *Schistosoma mansoni* infection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **97**: 53 - 58.
- SPATZ, L., VIDIGAL, T. H. D. A, CALDEIRA, R. L., DIAS NETO, E., CAPPA, S. M. G. & CARVALHO, O. S., 1999. Study of *Biomphalaria tenagophila tenagophila*, *Biomphalaria tenagophila guaiabensis* and *Biomphalaria occidentalis* by polymerase chain reaction amplification and restriction enzyme digestion of the ribossomal RNA intergenic spacer regions. *J. Moll. Stud.*, **65**: 143.
- STOTHARD, J.R., HUGHES, S. & ROLLINSON, D., 1996. Variation within the Internal Transcribed Spacer (ITS) of ribosomal DNA genes of intermediate snails hosts within the genus *Bulinus* (Gastropoda:Planorbidae). *Acta Tropica*, **61** (1): 19-29.
- THERON, A., PAGES, J. R. & ROGNON, A., 1997. *Schistosoma mansoni*: distribution patterns of miracidia among *Biomphalaria glabrata* snail as related to host susceptibility and sporocyst regulatory processes. *Exp. Parasitol.*, **85**: 1-9.
- VIDIGAL, T. H. D. A., CALDEIRA, R. L., SIMPSON, A. J. G. & CARVALHO, O. S., 2001. Identification of *Biomphalaria havanensis* and *Biomphalaria obstructa* populations from Cuba using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism of the ribosomal RNA intergenic spacer. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **96**: 661-665.
- VIDIGAL, T. H., CARVALHO, O. S. & NETO, E. D., 1994. *Biomphalaria glabrata*: Extensive genetic variation in Brazilian isolates revealed by random amplified polymorphic DNA analysis. *Experimental Parasitology*, **79**: 187-194.
- VIDIGAL, T. H., NETO, E. D., SPATZ, L., NUNES, D. N., PIRES, E. R., SIMPSON, A. J. & CARVALHO, O. S., 1998. Genetic variability and identification of the intermediate snail hosts of *Schistosoma mansoni*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **93**: 103-110.

- VIDIGAL, T. H. D. A., NETO, E. D., CALDEIRA, R. L, SIMPSON, A. J. & CARVALHO, O. S., 2000. Further Studies on the Molecular Systematics of *Biomphalaria* Snails from Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **95** (1): 57-66.

- VIDIGAL, T. H., NETO, E. D., SIMPSON, A. J. & CARVALHO, O. S., 1996. A low stringency polymerase chain reaction approach to identification of *Biomphalaria glabrata* and *B. tenagophila*, Intermediate hosts of *Schistosoma mansoni* in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **91** (6): 739-744.

- WELSH, J. & McCLELLAND, M., 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.*, **18**: 7213-7218.

- WILLIAMS, J. G. K., KUBELICK, A. K, LIVAK, K.. J., RAFALSKI, J. A. & TINGEY, S. V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*, **18**: 6531-6535.

- WORLD HEALTH ORGANIZATION, [WHO], 1993. Public Health impact of Schistosomiasis: disease and mortality. *Tech. Rep. Ser.*, **830**: 657-662.

- WORLD HEALTH ORGANIZATION, [WHO], 2002. Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis. *Tech. Rep. Ser.*, **912**.