



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA  
INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL



MESTRADO EM PARASITOLOGIA MÉDICA

**APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE “Nested PCR” DURANTE  
O PERÍODO PRÉ-PATENTE PARA IDENTIFICAÇÃO DE  
*Schistosoma mansoni* NO HOSPEDEIRO INTERMEDIÁRIO  
*Biomphalaria glabrata***



**Silvânia da Veiga Leal**

2010



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA  
INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL



MESTRADO EM PARASITOLOGIA MÉDICA

**APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE “Nested PCR” DURANTE  
O PERÍODO PRÉ-PATENTE PARA IDENTIFICAÇÃO DE  
*Schistosoma mansoni* NO HOSPEDEIRO INTERMEDIÁRIO  
*Biomphalaria glabrata***

Silvânia da Veiga Leal

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

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Doutora Maria Amélia Grácio

Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup> Doutora Maria Manuela Calado

2010

## 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.

## Publicação no âmbito deste estudo

Detecção do *Schistosoma mansoni* no molusco *Biomphalaria glabrata* no período pré-patente por Nested-PCR. S. Leal., M.M. Calado e M.A. A.Grácio. [*Acta Paras port.*, 2009, **16** (1/2): 416-417].

# ÍNDICE

ÍNDICE .....	i
DEDICATÓRIA .....	iii
AGRADECIMENTOS.....	v
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS .....	x
CAPITULO I - INTRODUÇÃO GERAL .....	i
1 <i>Schistosoma mansoni</i> .....	1
1.1. Considerações gerais .....	1
1.2. Características morfológicas .....	1
1.3. Distribuição geográfica .....	3
1.4. Ciclo de vida.....	4
1.4.1. - Miracídio do <i>Schistosoma mansoni</i> .....	6
1.4.2. - Penetração do miracídio no hospedeiro intermediário .....	7
1.5. Transmissão e Fonte de infecção da Schistosomose .....	7
2. <i>Biomphalaria glabrata</i> .....	8
2.1. Características morfológicas gerais.....	8
2.2. Características gerais da concha.....	8
2.3. Classificação Taxonómica da <i>B. glabrata</i> .....	9
2.4. - Genoma de <i>Biomphalaria glabrata</i> .....	12
2.5. - Habitat.....	13
2.6. Distribuição geográfica .....	13
2.7. Ciclo de vida da <i>Biomphalaria glabrata</i> .....	14
2.8. Detecção de <i>S. mansoni</i> em moluscos <i>B. glabrata</i> .....	15
3. Relação parasita/ hospedeiro intermediário (molusco).....	16
3.1. Interação <i>S. mansoni</i> / hospedeiro intermediário.....	16
3.2. Alterações histológicas do hospedeiro intermediário após a penetração do parasita.....	17
3.3. - Mecanismo imunológico do hospedeiro intermediário.....	18
4. A Biologia molecular aplicada ao estudo dos moluscos.....	18
2. Objectivos .....	21
2.1. Objectivo geral: .....	21

2.2.	Objectivos específicos:.....	21
CAPÍTULO III - MATERIAL E MÉTODOS .....		22
3.	Material e Métodos .....	23
3.1.	Obtenção dos moluscos <i>B. glabrata</i> .....	23
3.2.	Exposição de <i>B. glabrata</i> a <i>S. mansoni</i> .....	23
3.3.	Dissecção dos moluscos <i>B. glabrata</i> .....	24
3.4.	Extracção do ADN genómico.....	25
3.4.1.	Extracção do ADN genómico de <i>B. glabrata</i> .....	25
3.4.2.	Extracção do ADN genómico de <i>S. mansoni</i> adultos .....	26
3.5.	Quantificação do ADN genómico .....	26
3.6.	Deteção de ADN de <i>S. mansoni</i> em <i>B. glabrata</i> .....	27
3.6.1.	PCR Simples .....	27
3.6.2.	Nested PCR (NPCR) .....	29
3.7.	Quantificação dos produtos de PCR amplificados .....	30
3.8.	Amplificação de <i>S. mansoni</i> adultos .....	30
3.9-	Validação de sensibilidade da técnica .....	32
CAPITULO IV - RESULTADOS .....		33
4.	Resultados .....	34
4.1.	Determinação da especificidade das técnicas de deteção molecular (PCR, NPCR). .....	34
4.2.	Amplificação da Região Interna Transcrita (ITS) dos vermes adultos de <i>S. mansoni</i> .....	35
4.3.	Identificação de infecção no molusco no período pré-patente por NestedPCR.....	36
4.4.	Validação da sensibilidade da técnica.....	39
CAPITULO V- DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....		40
5-	Discussão e Conclusões.....	41
5.1.	Discussão.....	41
5.2.	Conclusões.....	43
CAPÍTULO VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....		44
ANEXOS .....		53
Obtenção de isolados de <i>Schistosoma mansoni</i> segundo o protocolo da UHMM/UPMM/IHMT, adaptado de Duvall, R.H.& Dewitt, W.B.,1967.....		54

# DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho  
ao meu querido filho Márcio e  
ao meu irmão Samuel, (*in memoriam*)

## AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Maria Amélia Grácio pelos conhecimentos transmitidos aos longos desses dois anos. Pela sua ajuda imprescindível nos momentos mais difíceis.

À Professora Doutora Manuela Calado pela sua ajuda imprescindível, pela disponibilidade, paciência e dedicação sempre presente. Obrigada!

À Técnica Principal Isabel Clemente por todo o apoio prestado, principalmente na infecção dos moluscos.

Ao banco Millennium BCP pela bolsa de estudos concedida.

À doutora Ana Ferreira pelo apoio e carinho demonstrado ao longo desses anos.

À Fundação Cidade de Lisboa pela amizade, pelos bons momentos de convívio, um especial obrigado, à doutora Elisabete Martins.

Às minhas colegas de Mestrados, Lisa e Ângela pelos bons momentos passados e pelo apoio laboratorial.

À todas as minhas Amigas em especial:

Ana Filipa pelo carinho e ajuda nas configurações dos textos;

Anilda, Maria Alice, Hendira e Linda pela coragem e pelo carinho com que cuidaram do meu filho Márcio ao longo destes anos.

Denise pelo carinho, apoio e pela bela amizade que construímos;

Heloísa pela coragem e carinho demonstrado ao longo destes anos.

Ermelinda pelo carinho e especialmente por ter cuidado do Márcio, obrigada

A todos os meus amigos que sempre me apoiaram.

A toda a minha família um especial obrigada.

Aos meus tios Eduardo, Armindo e Linete pelo carinho e apoio ao longo destes anos longe de casa, muito obrigada!

Ao meu querido tio Horácio, um especial obrigada pela força e carinho.

À Fernanda pela coragem, carinho e amizade.

Ao meu amor Emanuel, agradeço toda a paciência, apoio, carinho e amor. Obrigada pela tua serenidade, insistência e força para que eu levasse até ao fim esta fase da minha vida!

À minha irmã Dânia pela força, coragem, obrigada por tudo mana.

Ao meu irmão Isaías pelo carinho.

À minha querida sobrinha e afilhada Anícia pelos momentos alegres.

Aos meus queridos pais, agradeço do fundo do meu coração por acreditarem em mim, pelo incentivo incansável e pelo apoio incondicional. Tudo o que sou, devo a vós! ADORO-VOS!

Ao amor da minha vida, Márcio pelos momentos felizes. AMO-TE filho.

A Deus pela bênção divina.

Agradeço a todas as pessoas que directa ou indirectamente me ajudaram a levar mais esta etapa da minha vida até ao fim.

## RESUMO

*Biomphalaria glabrata*, molusco de água doce, desempenha um importante papel em Parasitologia Médica, por ser o hospedeiro intermediário de *Schistosoma mansoni*, tremátode digenético responsável pela schistosomose intestinal. A detecção de moluscos infectados pelo *Schistosoma mansoni* tem uma grande importância em Saúde pública, porque identifica focos de transmissão da schistosomose. As limitações dos métodos clássicos para o diagnóstico de infecções pré-patentes fazem com que os métodos de biologia molecular sejam vistos como possíveis alternativas através da detecção de ADN do *S. mansoni* em moluscos hospedeiros. A detecção de sequências específicas de ADN por reacção de polimerase em cadeia (PCR) tem-se verificado ser de extrema importância para a análise genética e diagnóstico de várias doenças infecciosas. Neste estudo foi aplicada a técnica de Nested-PCR, com o objectivo de identificar, no período pré-patente, *S. mansoni* em moluscos expostos a 1, 5 e 10 mirácidos em diferentes períodos de tempo. Foram utilizados moluscos das estirpes albina e selvagem de *B. glabrata*. Para a realização das técnicas de PCR e de Nested-PCR (NPCR) foram utilizados dois pares de oligonucleótidos desenhados especificamente para detectar o ADN de *S. mansoni*. Verificou-se amplificação do fragmento de ADN do parasita em 80% das amostras analisadas, independentemente da dose de mirácidos e do período de exposição. O método utilizado é altamente sensível, mostrando ser uma ferramenta útil na detecção de hospedeiros intermediários de *S. mansoni*, consequentemente na identificação de focos de schistosomose intestinal.

Palavras-chave: *Schistosoma mansoni*, *Biomphalaria glabrata*, período pré-patente e Reacção em Cadeia de Polimerase.

## ABSTRACT

*Biomphalaria glabrata* is a freshwater snail that plays an important role as intermediate host of *Schistosoma mansoni*, a digenetic trematode responsible for intestinal schistosomiasis. The detection of snails infected by *Schistosoma mansoni* is of great importance to public health, because it identifies possible focus of transmission of Schistosomose. The limitations of the traditional methods for the diagnosis of pre-patent infections originate that molecular biology methods are seen as possible alternatives to detect DNA of *S. mansoni* in the host snail. The detection of specific DNA sequences by PCR was confirmed to be of extreme importance for the genetic analysis and the diagnosis of a various infectious diseases. In this study, a Nested-PCR technique was used, with the aim of identifying, pre-patent periods *S. mansoni* in snails exposed to 1, 5 and 10 miracidia for different periods of time. We used snails strains of albino and wild *B. glabrata*. For the PCR and Nested- PCR (NPCR) two pairs of oligonucleotides were used, designed specifically to detect the DNA of *S. mansoni*. There was amplification of the parasite DNA fragment of interest in 80% of the samples, independently of the infecting dose and exposure time. The method proved to be highly sensitive, thus being a useful tool in the detection of intermediate host of *S. mansoni*, and therefore contributing to the identification of focus of intestinal Schistosomose.

Keywords: *Schistosoma mansoni*, *Biomphalaria glabrata*, pre-patent period and Polymerase Chain Reaction.

# ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

## A. Figuras

Figura 1:	<i>Schistosoma mansoni</i> adultos (adaptado do site <a href="http://www.weichtiere.at">www.weichtiere.at</a> )	2
Figura 2:	Mapa de áreas endémicas do <i>Schistosoma mansoni</i> (adaptado do site <a href="http://www.itg.be">www.itg.be</a> )	3
Figura 3:	Ciclo de Vida do <i>Schistosoma mansoni</i> : (Adaptado de Rey, 2008)	5
Figura 4:	Miracídio do <i>S. mansoni</i> (cedida por Pedro Ferreira, IHMT)	6
Figura 5:	Face superior e inferior de <i>Biomphalaria glabrata</i> (cedida por Guerreiro, 1993)	9
Figura 6:	Classificação taxonómica do género <i>Biomphalaria</i> da classe Gastropoda (adaptado de Guerreiro, 1993)	11
Figura 7:	Genoma de <i>B. glabrata</i> (adaptada do site <a href="http://www.biology.unm.edu">www.biology.unm.edu</a> )	12
Figura 8:	Cariotipo de <i>B. glabrata</i> (Goldman et al, 1983)	12
Figura 9:	Extracção do molusco da concha (Original de S. Leal)	24
Figura 10:	Corpo do molusco indicando a região cefalopodal (original de S. Leal)	25
Figura 11:	Especificidade de amplificação de PCR usando os oligonucleótidos Unvre16 e SEQ_24. M- marcador de peso molecular; 1-12- <i>B. glabrata</i> ; Cp (controlo positivo) - <i>S. mansoni</i> adulto, Cn- Controlo negativo	34
Figura 12:	Especificidade de amplificação de PCR usando os oligonucleótidos SEQ_25 e SEQ_26. M- marcador de peso molecular; 1-3- <i>B. glabrata</i> ; Cp- (controlo positivo) <i>S. mansoni</i> adulto, Cn- Controlo negativo.....	35
Figura 13:	Gel de agarose a 1% da amplificação da Região ITS do ADN de <i>S. mansoni</i> , M- marcador de peso molecular; 1 - 12- <i>S. mansoni</i>	35
Figura 14:	Amostras de <i>B. glabrata</i> em gel de agarose a 1%, expostas a um miracídio em diferentes períodos de tempo. M- marcador de peso molecular; 1- <i>B. glabrata</i> (albina), 2- <i>B. glabrata</i> (selvagem) com um dia de exposição; 3- <i>B. glabrata</i> (selvagem), 4- <i>B. glabrata</i> (albina) 5- <i>B. glabrata</i> (selvagem) com a três dias de exposição; 6- <i>B. glabrata</i> (selvagem), 7 <i>B. glabrata</i> (albina) com sete dias de exposição; Cp- Controlo positivo, Cn- Controlo negativo	37

Figura 15: Gel de agarose a 1% das amostras de *B. glabrata*, expostas a cinco miracídios em diferentes períodos de tempo. M- marcador de peso molecular; 1- *B. glabrata* (albina), 2-*B.glabrata* (selvagem) com um dia de exposição; 3-*B. glabrata* (albina) 4-*B. glabrata* (selvagem) com a três dias de exposição; 5-*B. glabrata* (selvagem), 6 *B.glabrata* (albina), 7- *B. glabrata* (selvagem), - com sete dias de exposição;. Cp- Controlo positivo, Cn- Controlo negativo 38

Figura 16: Figura 16: Gel de agarose a 1% das amostras de *B. glabrata*, expostas a dez miracídios em diferentes períodos de tempo. M- marcador de peso molecular 1- *B. glabrata* (selvagem), 2-*B.glabrata* (selvagem), 3-*B. glabrata* (albina) com um dia de exposição, 4-*B. glabrata* (selvagem) 5-*B. glabrata* (albina), 6-*B. glabrata* (selvagem) com a três dias de exposição; 7 *B.glabrata* (albina) com sete dias de exposição; Cp- Controlo positivo, Cn- Controlo negativo..... 38

Figura 17: Amostras de *B. glabrata*, submetidas a diluições (1:10; 1:30, 1:50 e 1:100 respectivamente). M- marcador de peso molecular; 1 a 5- amostras com um dia de exposição; 6 a 9- amostras com três dias de exposição; 10- amostra de *B. glabrata* infectada; 11 a 14- amostras com sete dias de exposição; Cp- Controlo positivo, Cn- Controlo negativo..... 39

## B. Tabelas

Tabela 1: Plano de estudo utilizado para a exposição dos moluscos a miracídios de <i>S. mansoni</i> . ....	24
Tabela 2 - Oligonucleótidos utilizados na amplificação do ADN dos moluscos <i>B. glabrata</i> .....	27
Tabela 3: Condições de amplificação das amostras por PCR.....	30
Tabela 4: Oligonucleótidos utilizados na amplificação da região do ITS do <i>S. mansoni</i> .....	31
Tabela 5: Condições de amplificação por PCR .....	31
Tabela 6: Amostras de <i>B. glabrata</i> analisadas por NestedPCR.....	36

## CAPITULO I - INTRODUÇÃO GERAL

# 1 *Schistosoma mansoni*

## 1.1. Considerações gerais

*Schistosoma mansoni* é um tremátode que pertence à classe DIGENEA e à família SCHISTOSOMATIDAE. É o agente responsável pela schistosomose intestinal, devido a localização dos parasitas nas vénulas da parede do intestino grosso.

O género *Schistosoma* difere dos outros Digenea por apresentarem sexos separados (dióicos) e um acentuado dimorfismo sexual, e pelo facto dos machos apresentarem menos de 10 massas testiculares (Rey, 2008). Os vermes adultos de ambos os sexos residem nas vénulas do plexo mesentérico (Ferreira, 2002).

## 1.2. Características morfológicas

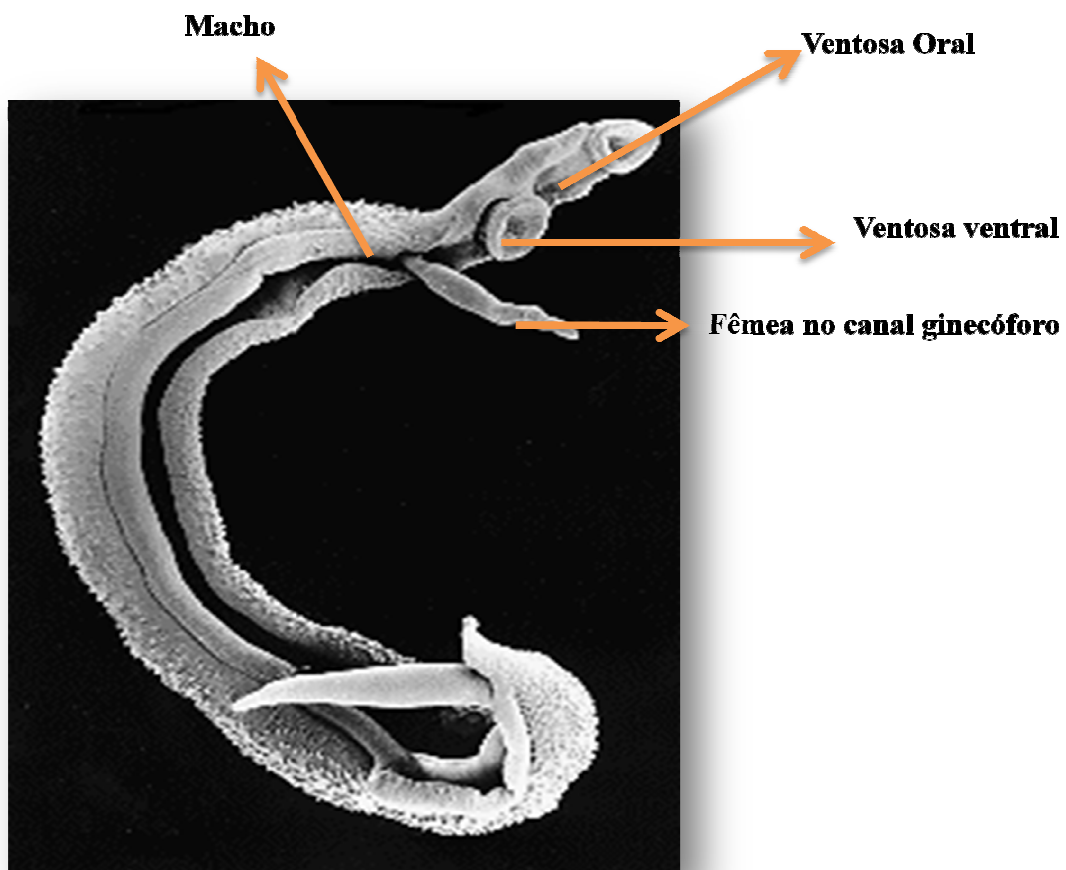
Contrariamente aos outros tremátodes, os tremátodes do género *Schistosoma* apresentam-se como vermes delgados e longos. Os machos medem cerca de 1cm de comprimento (0,6 a 1,4 cm) por 0,11 cm de largura, e são de cor branca. Na extremidade anterior apresenta uma ventosa oral, afunilada, seguida de uma segunda ventosa ventral (**Figura 1**). O aparelho genital dos machos consiste em 6 a 8 massas testiculares pequenas situadas dorsalmente, no início do segmento posterior. O macho apresenta as margens laterais do seu corpo, largo e achatado, enroladas de modo a formar um canal longitudinal o canal ginecóforo, o qual serve para alojar a fêmea quando do acasalamento (Neves, 2005 e Rey, 2008).

As fêmeas têm o corpo cilíndrico, mais delgado do que o dos machos (1,2 a 1,6 cm), encontram-se numa cavidade (canal ginecóforo) do corpo dos machos (**Figura 1**). Apresentam uma coloração mais escura e acinzentada, devido à presença do pigmento da hemozoína no tubo

digestivo. Este pigmento deriva da ingestão do sangue. O ovário é oblongo, ligeiramente lobulado, localizando-se na metade anterior do corpo (Rey, 1992 e 2008).

O revestimento externo dos vermes adultos é composto por sete camadas, estas estão continuamente em processo de renovação (Rey, 2008).

Em ambos os sexos o tubo digestivo inicia-se na extremidade anterior, no fundo da ventosa oral e é composto por um esófago, que se divide em dois ramos simples (direito e esquerdo) e voltam a reunir-se em um ceco único. Não há abertura anal (Neves, 2005).



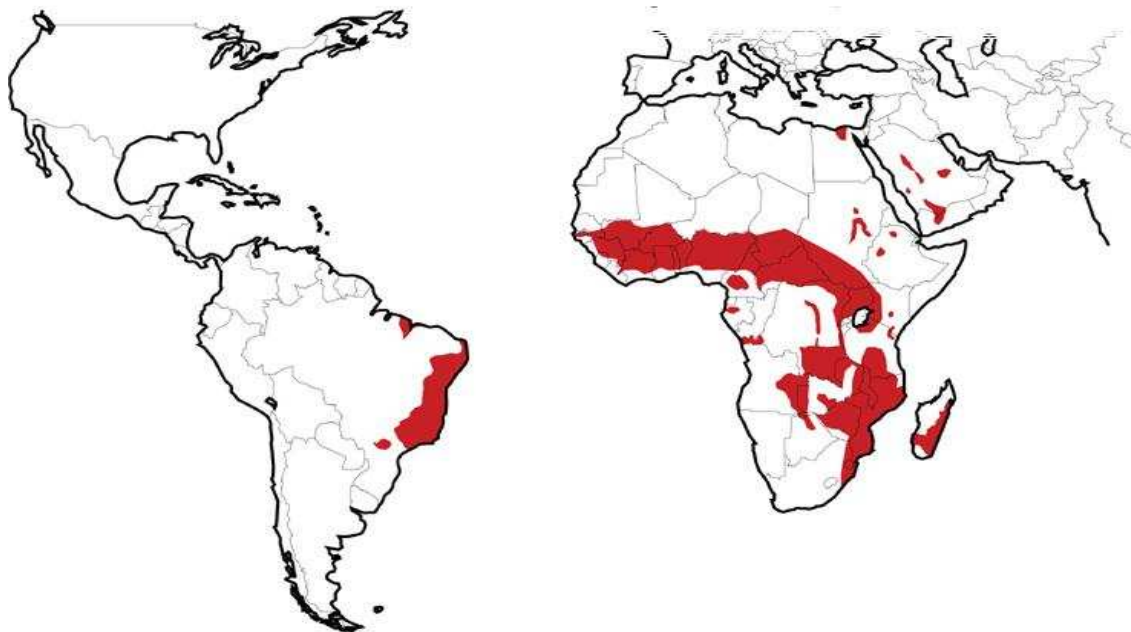
**Figura 1:** *Schistosoma mansoni* adultos (adaptado do site [www.weichtiere.at](http://www.weichtiere.at))

### 1.3. Distribuição geográfica

Schistosomose é um problema de Saúde Pública mundial, afectando mais de 200 milhões de pessoas em todo mundo (Hamburger, 1998 e Pontes, 2002). A infecção pelo *Schistosoma mansoni* é endémica em 54 países e territórios da América do Sul, Caribe, África e Mediterrâneo Oriental (Pontes, 2002).

Em África a doença é autóctone e um dos maiores focos encontra-se no Delta do Nilo e na zona intertropical ao Sul do Sahara. Os países mais afectados são: o Egipto, o Sudão, a República Centro-Africana, e Madagáscar (Rey, 2008) (**Figura 2**).

Na Ásia, apenas a Arábia Saudita, o Iémen e Oman apresentam focos desta infecção (Iarotski, 1981). Nas Américas, a schistosomose abrange muitos estados do Brasil e da Venezuela, além de territórios em Suriname, Porto Rico, republica Dominicana e Antilhas (Rey, 2008) (**Figura 2**).



**Figura 2:** Mapa de áreas endémicas do *Schistosoma mansoni* (adaptado do site [www.itg.be](http://www.itg.be)).

## 1.4. Ciclo de vida

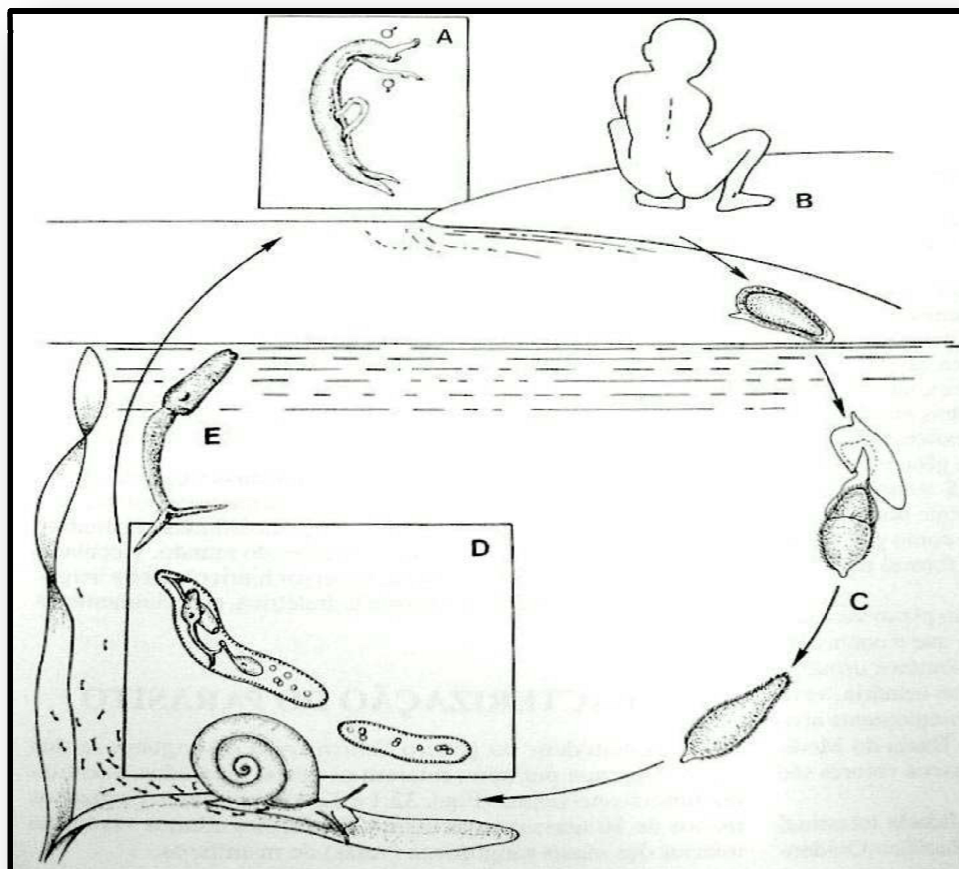
*S. mansoni* requer dois hospedeiros para completar o seu ciclo de vida: um molusco de água doce (hospedeiro intermediário) do género *Biomphalaria* e um vertebrado hospedeiro definitivo (Ferreira, 2002).

Os ovos de *S. mansoni* quando eliminados com as fezes humanas (**Figura 3B**), já encontram-se embrionados. Ao atingirem colecções de água doce com condições adequadas (temperatura entre 20 e 30 °C, pH e composição química) eclodem, dentro de um período relativamente curto (minutos), os miracídios (**Figura 3C**), a forma infectante para *Biomphalaria* spp. Os miracídios nadam e penetram os tecidos moles do caracol, seu hospedeiro intermediário. Após a invasão, os cílios dos miracídios desaparecem, os músculos degeneram e em poucos dias, as larvas transformam-se em duas gerações de esporocistos, esporocistos mãe e esporocistos filhos (**Figura 3D**) e depois em cercárias (Grácio, 2008).

As cercárias (**Figura 3E**), a forma infectante para os humanos (hospedeiro definitivo) são libertadas do molusco e nadam à procura do hospedeiro definitivo. Ao encontrá-los penetram activamente a pele deste (operação que decorre num período demais ou menos 5 minutos). Na penetração, a cercária perde a cauda e a nova forma larvar recebe o nome de schistosomulo (Rey, 2008). Alguns schistosomulos são destruídos na pele e outros atingem a circulação passando por diversos órgãos (coração, pulmões e fígado) e são lançados na circulação arterial. É no sistema porta intra-hepático que os schistosomulos atingem a fase adulta. Os vermes adultos (**Figura 3A**) acasalam e migram contra a corrente sanguínea até às veias mesentéricas inferiores e suas ramificações. As fêmeas começam a depositar os ovos nas vénulas (5 a 8 semanas após a penetração das cercárias). Os ovos já embrionados movem-se progressivamente em direcção ao lúmen do intestino e são eliminados com as fezes (Neves, 2005 e Rey 1992). Alguns ovos não conseguem alcançar correctamente o seu percurso, estes penetram nos vasos sanguíneos da

circulação porta e entram no fígado, onde muitos ficam retidos e dão origem a patologia ou podem ainda invadir o tecido hepático e entrar na circulação sistêmica, neste caso podem atingir e instalar-se em qualquer órgão do hospedeiro definitivo (Grácio, 2008 e Rey, 1992).

Os ovos viáveis eliminados com as fezes que venham a atingir coleções de água adequadas às necessidades bio-ecológicas do parasita irão iniciar um novo ciclo de vida com a eclosão de miracídios (Grácio, 2008) (Figura 3).



**Figura 3:** Ciclo de Vida do *Schistosoma mansoni*: (Adaptado de Rey, 2008).

#### **1.4.1. - Miracídio do *Schistosoma mansoni***

O miracídio (**Figura 4**), a forma infectante para o hospedeiro intermediário *Biomphalaria spp* é o primeiro estágio larvar da fase livre do *S. mansoni*. Apresenta forma cilíndrica, com dimensões médias de 180µm de comprimento por 64µm de largura (Neves, 2005).

Está revestido por cílios, os quais permitem o movimento no meio aquático, na extremidade anterior encontra-se um par de glândulas adesivas e uma glândula de penetração e, na extremidade posterior, um grupo de células germinativas e um sistema excretor (Rey, 1992). A penetração faz-se com a ajuda de uma glândula apical produtora de enzimas histolíticas e duas glândulas cefálicas que contribuem para a aderência. Durante a fase de vida livre na água, a actividade deste organismo é sustentada pelas reservas de glicogénio e pelo consumo de oxigénio do meio (Rey, 2008).

O curto período de vida dos miracídios e a presença no meio aquático de factores bióticos e abióticos que lhe são desfavoráveis, fazem com que haja perdas significativas do parasita nesta fase larvar. Para continuar o seu ciclo, o miracídio necessita, obrigatoriamente, de encontrar o molusco hospedeiro intermediário adequado (Neves, 2005).



**Figura 4: Miracídio do *S. mansoni* (cedida por Pedro Ferreira, IHMT)**

#### **1.4.2. - Penetração do miracídio no hospedeiro intermediário**

A penetração dos miracídios no hospedeiro específico deve ocorrer nas primeiras horas após a eclosão, porque o poder invasivo diminui com a idade do miracídio e reduz-se praticamente a zero depois de 10 a 12 horas após a eclosão (Rey, 2008). Após a aderência, a penetração dá-se pela conjugação de movimentos rotatórios do miracídio em torno do seu eixo e da acção lítica da glândula apical de penetração. Este processo demora aproximadamente 3 a 15 minutos, sendo acelerada com o aumento da temperatura (40°C) (Neves, 2005 e Rey, 2008). Temperaturas abaixo dos 10°C impedem a penetração de *S. mansoni* em *Biomphalaria glabrata*. A penetração no molusco pode fazer-se por qualquer parte do tegumento, através das zonas expostas do molusco, tais como, o pé, tentáculos e colar do manto. Após a penetração, o miracídio inicia o seu desenvolvimento nos tecidos e nos seios linfáticos do pé ou da cabeça, junto ao local da entrada, ou migra para as cavidades dos órgãos (Rey, 1992, 2008).

Ao penetrar no molusco o miracídio perde o seu revestimento epitelial ciliado passado umas horas (5h), imobiliza-se nas proximidades do ponto de penetração (Neves, 2005). Em seguida inicia-se uma alteração estrutural, transformando-se em uma estrutura sacular alongada designada por esporocisto-mãe ou esporocisto primário. No esporocisto de 1ª geração, proliferam células germinativas do miracídio, dando origem a esporocistos-filhos ou esporocistos secundários e depois em cercárias, forma infectante para os hospedeiros definitivo (Grácio, 2008 e Rey, 2008).

#### **1.5. Transmissão e Fonte de infecção da Schistosomose**

A transmissão da schistosomose depende estreitamente do contacto humano com as colecções de água doce contaminadas com cercárias. As cercárias penetram activamente a pele e as mucosas, as regiões do corpo mais afectadas são os membros inferiores (pés e as pernas) (Neves, 2005). As fontes de infecções são os lagos, as lagoas os canais de irrigação ou de drenagem onde se

acumule água e que são frequentados pela população, onde tomam banho, lavam roupas e usam água para fins domésticos, etc. (Rey, 1992).

## **2. *Biomphalaria glabrata***

### **2.1. Características morfológicas gerais**

*B. glabrata* é um dos gastrópodes de água doce com maior importância em medicina, por ser hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni*, agente causal da schistosomose intestinal. (Knight, 2000 e Grácio, 2008).

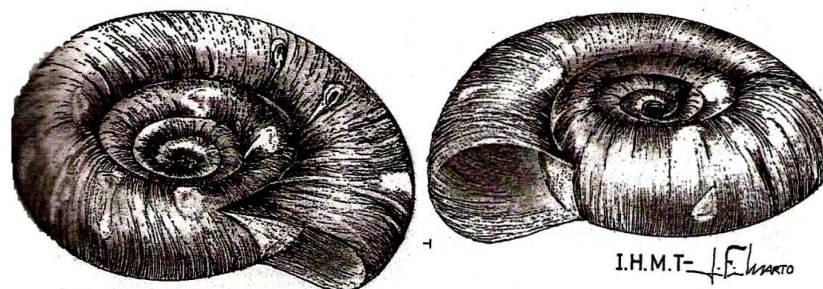
O corpo deste molusco consiste em, cabeça, massa visceral, pé e manto (Rey, 2008). Possui concha lisa e sem opérculo (Malek, 1974 e Grácio, 2008), um par de tentáculos, com olhos situados na base. É hermafrodita com abertura sexual separado (Faria, 2007).

### **2.2. Características gerais da concha**

*Biomphalaria* apresenta uma concha calcária, unilocular com forma discoidal, ligeiramente voltada para a esquerda, daí a designação de sinistral ou ultradextral. A concha é formada por três camadas, o periostracum, a camada primática e a camada nacarada (Lutz, 1919; Yung & Guyenot, 1920, Hyman, 1967 e Malek & Cheng, 1974).

O orifício, através da qual se projecta a região cefalopodal, está situado para diante e para baixo. Disso resulta, aquilo que se pode considerar uma fase superior também designada de fase direita, dorsal ou externa e uma fase inferior também conhecida por fase esquerda, ventral ou interna, devido à posição natural da concha, que serve de ponto de referência para a sua descrição (Guerreiro, 1993).

Neste género ambas as faces se mostram escavadas, embora a face direita se apresente ligeiramente acentuada, com uma depressão central a que damos o nome de umbílico (Figura 5) (Guerreiro, 1993 e Rey, 2008).



**Figura 5:** Face superior e inferior de *Biomphalaria glabrata* (cedida por Guerreiro, 1993)

### 2.3. Classificação Taxonómica da *B. glabrata*

*B. glabrata* pertence ao filo Mollusco e à classe Gastropoda. É um pulmonado por possuir “pulmões” na cavidade do manto.

Das seis classes pertencentes a este Filo apenas uma tem importância em medicina humana, a Classe Gastropoda, (**Figura 6**) por conter hospedeiros intermediários de tremátodes e/ou nemátodes patogénicos para o homem (Guerreiro 1993 e Grácio, 2008).

Existem 34 espécies, pertencentes ao género *Biomphalaria* sendo 22 desta espécie encontra-se nas Américas (Região Neotropical) (DeJong, 2001) e as restantes 12 são restritas do continente Africano (DeJong, 2001 e Jorgensen, 2007). Sendo assim, as espécies do género *Biomphalaria* distribuem-se por dois grandes grupos á americanas e africanas. (**Figura 6**).

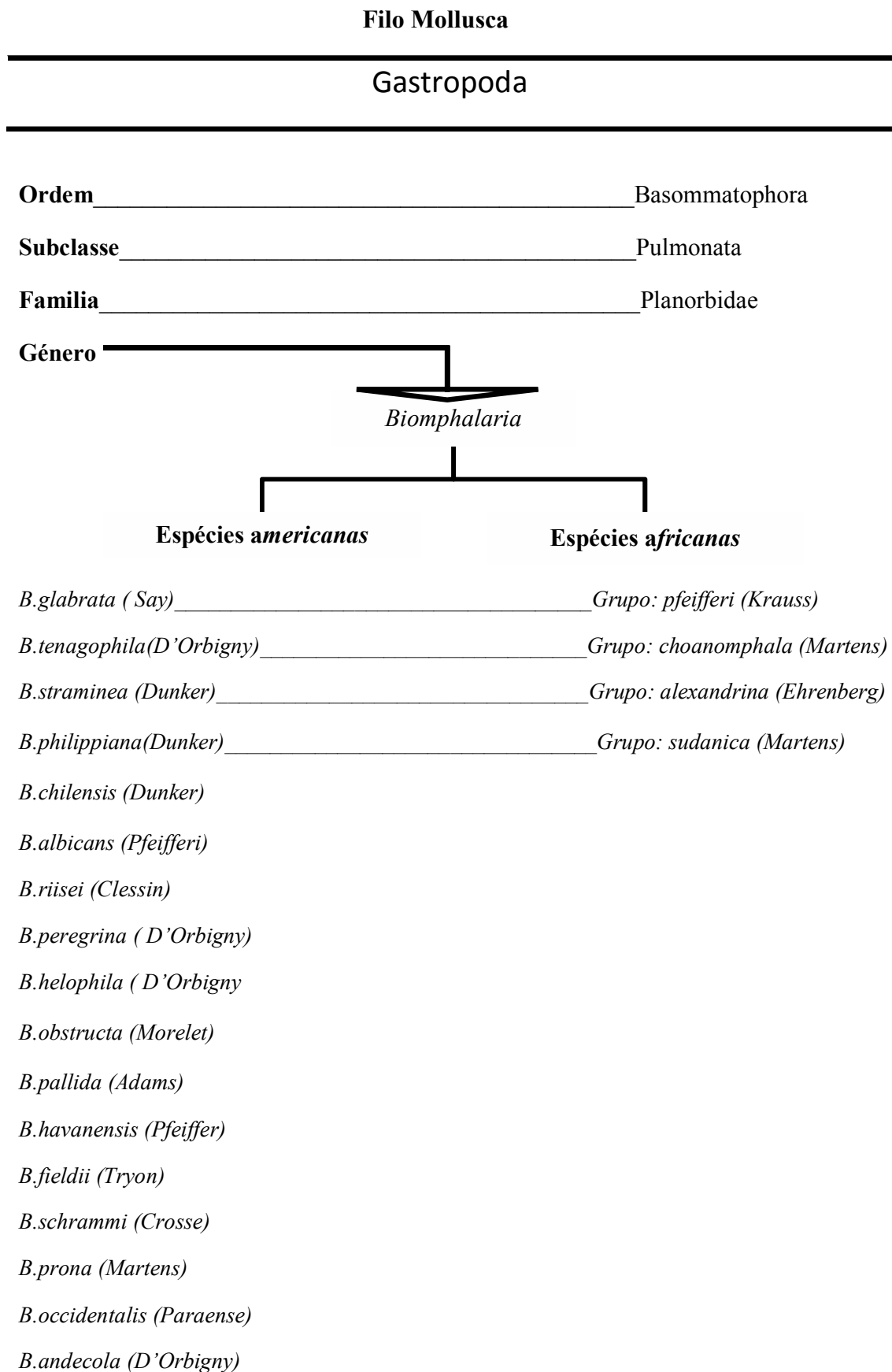
As espécies africanas foram agrupadas por Mandahl- Barth (1957) em 4 grupos (**Figura 6**) (Jorgensen, 2007).

O agrupamento das espécies de *Biomphalaria* é baseado na comparação das características morfológica da concha, dos órgãos reprodutores masculinos e femininos e da rádula (Caldeira, 2000 e Jorgensen, 2007).

As semelhanças existentes entre algumas espécies deste género levou ao agrupamento de algumas delas em complexos. Espécies americanas (Neotropical) consistem em dois complexos:

- 1) Complexo *Biomphalaria. straminea* constituído por *B. straminea*, *B. intermedia*, e *B. kuhniana*;
- 2) Complexo *Biomphalaria. tenagophila* formado por *B. tenagophila*, *B. t. guaiibensis* e *B. occidentalis*. (DeJong, 2001 e Faria, 2007).

**Figura 6:** Classificação taxonómica do género *Biomphalaria* da classe Gastropoda (adaptado de Guerreiro, 1993)



## 2.4. - Genoma de *Biomphalaria glabrata*

*Biomphalaria glabrata* apresenta um genoma mitocondrial circular haplóide com 18 cromossomas pequenos e monomórficos (Figuras 7 e 8.). O tamanho do seu genoma mitocondrial é de aproximadamente 950 Mb. É o mais pequeno de todos os gastrópodes contendo 13670 nucleotídeos. (DeJong, 2005; Gregory, 2003). *B. glabrata* é a espécie do género *Biomphalaria* em que o seu genoma mitocondrial já foi totalmente sequenciado (Janotti -Passos, 2007).

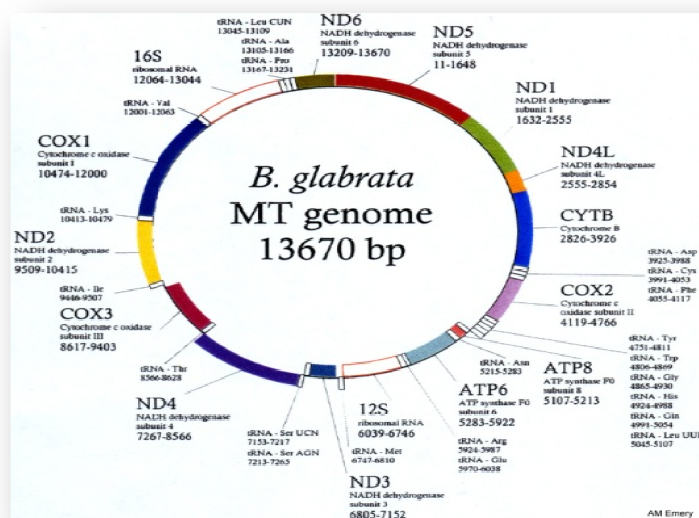


Figura 7: Genoma de *B. glabrata* (adaptada do site [www.biology.unm.edu](http://www.biology.unm.edu))

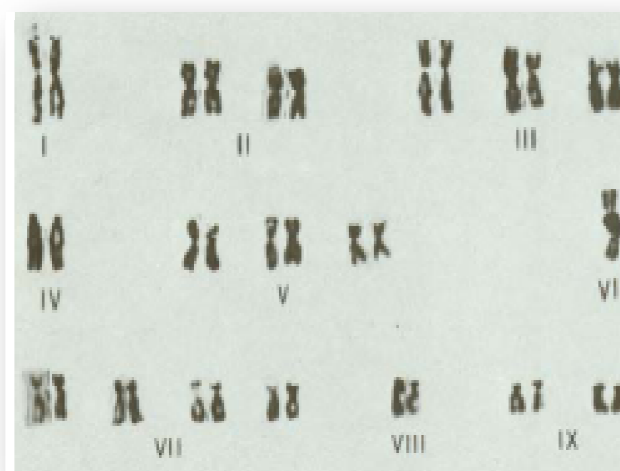


Figura 8: Cariotipo de *B. glabrata* (Goldman *et al*, 1983).

## 2.5. - Habitat

Os moluscos do género *Biomphalaria* podem ser encontrados nas águas doces das regiões tropicais pouco profundas, algo poluídas, estagnadas ou de fraca corrente, ricas em matérias orgânicas (Romeiro & Aguiar, 1954, Fraga de Azevedo e Medeiros 1955 e Grácio, 1995).

Os habitats de eleição destes gastrópodes planorbídios, são as águas mineralizadas ou seja, águas ricas em sais alcalinos e alcalino terrosos, pouco movimentadas, ricas em vegetação aquática, de fundo iodado e expostas ao sol, com temperaturas óptimas entre os 22° e 26°C (Schwetz, 1951; Malek 1958 e Harry & Aldrich, 1958). Os habitats podem ser resultantes da água da chuva que ficou estagnada e que originou charcos, ou são valas e até mesmo pequenas lagoas (Romeiro & Aguiar, 1954; Malek, 1958 e Grácio, 1995). Mas também podem ser encontras em tanques, rios de fraco caudal e nos locais que se situam próximo das populações (Azevedo, F. & Medeiros, 1955).

A vegetação submersa constitui um apoio para estes animais, que nele se fixam ou se alimentam. A alimentação é à base de folhas e outros órgãos de plantas aquáticas, algas, bactérias, lodo, excrementos de outros animais, etc. (Neves, 2005).

## 2.6. Distribuição geográfica

A distribuição geográfica do género *Biomphalaria* está associada a factores climáticos, quer sejam eles térmicos ou sazonais, por factores hídricos e orográficos. (Deschiens, 1954, Malek, 1958; Barbosa & Olivier, 1958; OMS, 1967; e Pointier, 1982). Face á distribuição destes factores, vamos encontrar este género de molusco nas regiões quentes e húmidas dos países tropicais e subtropicais do Globo.

À excepção de algumas regiões do Norte, tais como Marrocos, Tunísia Sara e Maurítânia, toda a África se tornou numa gigantesca área, onde estes moluscos encontram habitats propícios ao

seu desenvolvimento. Este género, onde se inclui o hospedeiro intermediário de *S. mansoni*, expandiu-se também aos territórios vizinhos, nomeadamente à ilha de Madagáscar, a Israel, à Arábia Saudita e ao Iémen (Wright, 1962; OMS, 1967; Berrie, 1973; Malek & Cheng, 1974 e Brown, 1994).

Na região Neotropical, este género de moluscos é encontrado na República Dominicana, Porto Rico, Antilhas Francesas (ilhas de Guadalupe, Martinica, Sta Lúcia), Brasil, Venezuela e Suriname (Butter, 1958; Harry & Aldrich e 1958; Malek, 1969,1980).

O clima incerto das regiões Neotropicais e Tropicais, impõe ainda trabalhos de irrigação constante, ou sistemas de drenagem favoráveis ao homem (utilização domestica e culturas de arroz, legumes, etc) o que conduz a uma rápida multiplicação e distribuição destes moluscos, levando a uma maior prevalência e disseminação da Schistosomose, derivada do contacto mais íntimo entre os humanos e os moluscos (Butter 1958 e Brown, 1994).

## **2.7. Ciclo de vida da *Biomphalaria glabrata***

*Biomphalaria* é essencialmente diplóide (2n), desde a formação do ovo, fases juvenis e adulto, até a produção dos gâmetas, células sexuais haplóides (n), cuja conjugação resulta o ovo (Guerreiro, 1993).

Estes moluscos apresentam um hermafroditismo caracterizado pela produção, simultânea de gâmetas masculinos e femininos, no mesmo indivíduo, possibilitando, quando isolados, uma autofecundação (Guerreiro, 1993). Embora sejam hermafroditas, podendo autofecundar-se, os moluscos desta espécie têm preferência pela reprodução cruzada quando as condições ambientais lhe são favoráveis. (Neves, 2005 e Vidigal, 1998).

A postura dos ovos é efectuada geralmente à noite, depositando dezenas de ovos, que permanecem unidos por uma delicada membrana envolvente, segregada pela glândula nidimental, a cápsula ovífera (Rey, 2008). As posturas são depositadas em qualquer estrutura sólida submersa, como plantas, paredes, pedras, madeira, concha de outros moluscos e até mesmo vasilhames de plástico encontrados em colecções aquáticas poluídas (Neves, 2005).

De acordo com Grasse (1968), os ovos são revestidos por duas membranas, uma interna fina, sólida e muito refringente, enquanto a outra, externa e espessa, é constituída por muitas camadas conjuntas. A eclosão dos caracóis ocorre aproximadamente sete dias após a postura. O tamanho do molusco tem relação com a densidade populacional e as condições das águas. (Neves, 2005).

O desenvolvimento dos moluscos é directo, sem a presença de metamorfoses. O recém eclodido é semelhante ao adulto, mas em dimensões reduzidas.

## **2.8. Detecção de *S. mansoni* em moluscos *B. glabrata***

Para detectar exemplares de *B. glabrata* infectados com *S. mansoni* recorre-se geralmente, a duas técnicas, a primeira através da exposição do molusco à luz, em recipientes com água para estimular a libertação de cercarias (ocorre cerca de 3 a 4 semanas após a infecção) (Caldeira, 2004) e a segunda no esmagamento dos moluscos entre duas lâminas de vidro para a observação de cercárias ou esporocistos (Jannotti-Passos, 2006).

Contudo estes métodos não são capazes de detectar *S. mansoni* em moluscos infectados durante o período pré-patente nem após a morte dos moluscos. Assim os métodos moleculares têm sido utilizados para detectar a infecção por *S. mansoni* em ambas as situações (Hanelt *et al.* 1997, Jannotti-Passos *et al.* 1997 e Hamburger *et al.* 1998).

### 3. Relação parasita/ hospedeiro intermediário (molusco)

#### 3.1. Interacção *S. mansoni* / hospedeiro intermediário

No estudo das interacções parasita – molusco, o modelo experimental mais utilizado é *S. mansoni* e *B. glabrata* (Théron *et al.*, 1997, Connors *et al.*, 1998 e Sire *et al.*, 2001). Para o sucesso da infecção de *B. glabrata* pelo *S. mansoni* é fundamental que se verifique compatibilidade entre o hospedeiro intermediário e o parasita. Para que isso ocorra é preciso a presença de dois factores:

- i. Concordância entre a infectividade do parasita ou seja a capacidade deste de encontrar e penetrar no hospedeiro intermediário, evitando ou suprimindo a resposta imune do mesmo;
- ii. Susceptibilidade do hospedeiro intermediário (molusco), isto é, a sua adequabilidade fisiológica e ausência de resistência imunológica.

Ambos os factores possuem complexas bases genéticas, apresentando, por isso, variação entre as populações de parasitas e hospedeiros intermediários. (Bayne & Loker, 1987 e Adema & Loker 1997)

Uma das características das interacções digenea-molusco é o elevado grau de especificidade que apresentam (Van der Kapper & Loker, 1990). O *S. mansoni* parece estar estritamente relacionado com algumas espécies do género *Biomphalaria*. Com algumas excepções, cada espécie de digenea consegue apenas infectar grupos limitados de moluscos disponíveis, frequentemente apenas uma única espécies ou mesmo estirpes geográficas (Van der Kapper & Loker, 1990).

### **3.2. Alterações histológicas do hospedeiro intermediário após a penetração do parasita**

Segundo Malek, 1958, os estádios lavares do *S. mansoni* (miracídeos, esporocistos e cercárias) são responsáveis pelas lesões mecânicas, fisiológicas e até mesmo morfologias no interior das *Biomphalaria*. As alterações mecânicas são resultantes das migrações das larvas ao longo dos vários tecidos para atingirem os órgãos distais do molusco e as fisiológicas são causadas pelo consumo de alimentos digeridos (pelos planorbídios) e pela acumulação de substâncias tóxicas que os parasitas excretam (Faust, 1920, Faust & Hoffman, 1934). De acordo com Lutz (1919) e Brumpt (1940) as lesões morfológicas são derivadas da transformação dos miracídeos em esporocistos primários nos tentáculos, cabeça, pé e colar do manto dando origem a pequenos “tumores” visíveis a olho nu.

A infecção por *S. mansoni* afecta a capacidade reprodutora do caracol, devido á destruição gradual do ovotestis, tendo como consequência uma redução significativa do número de posturas, passível de apreciação por comparação com espécies não infectados (Coelho, 1954). Ainda, esta infecção é responsável por alterações de crescimento e do ciclo de vida dos moluscos, causando-lhes, amiúde, uma morte prematura.

A infecção natural de *Biomphalaria* é por vezes bastante intensa, podendo atingir a percentagem experimental, que pode ir até aos 100%, dependendo dos locais de contaminação, dos factores ambientais e, sobretudo de um complexo de diversos factores genéticos, que determinam o desenvolvimento ou a inibição do parasita no caracol (Newton, 1952).

### 3.3. - Mecanismo imunológico do hospedeiro intermediário

Os moluscos apresentam mecanismos de defesa contra a invasão dos parasitas, principalmente a fagocitose e o encapsulamento (Brown, 1994 e Malek, 1980). Segundo Newton (1952) nas espécies resistentes a *S. mansoni*, o miracídios e os esporocistos que sucedem são na sua maioria, envolvidos por reacção celular e destruídos por fagocitose.

As células responsáveis pela essa destruição são os amebócitos, que são macrófagos primitivos que circulam livremente no interior da hemolinfa do caracol e podem acumular-se em regiões específicas em volta dos esporocistos (Borges, 1998).

## 4. A Biologia molecular aplicada ao estudo dos moluscos

Como já foi referido anteriormente os dois, métodos utilizados no diagnóstico na detecção de infecção por *S. mansoni* em *Biomphalaria* spp são, a exposição dos moluscos á luz e esmagamento do molusco entre duas lâminas de vidro. Face as limitações deste métodos outras técnicas mais eficientes foram desenvolvidas baseados na detecção do ADN (ácido desoxirribonucleico) do parasita e no perfil de *B. glabrata* (Janotti-Passos, 2000).

Os métodos moleculares têm apresentado resultados satisfatórios na detecção e caracterização de algumas parasitoses intestinais. Estes métodos são de extrema sensibilidade uma vez que permitem a geração de cópias de sequências específicas a partir de uma cadeia de ADN molde, através de uma síntese enzimática “*in vitro*” (Souza; 2005). A sensibilidade e especificidade destes métodos permitem um diagnóstico de forma precoce de agentes infecciosos e monitorizar a progressão da doença e a resposta á terapêutica (Souza, 2005). Um dos métodos moleculares mais utilizados é a Reacção de Polimerização enzimática em Cadeia (PCR). Existem numerosas adaptações e modificações da técnica básica de PCR produzidas com o objectivo de, por exemplo, utilizar como alvo o ARN (ácido ribonucleico) RT-PCR, aumentar a sensibilidade e especificidade

*Nested*-PCR, amplificar ADN de sequência desconhecida PCR de largo espectro, ou quantificar o ADN alvo QC-PCR. (Ferreira, 2000).

## CAPITULO II – OBJETIVOS

## 2. Objectivos

A schistosomose ocupa o segundo lugar entre as doenças parasitárias mais graves (logo a seguir à malária), no que respeita ao número de pessoas infectadas e também à extensão das áreas (tropicais e subtropicais) em que a doença é endémica. Por outro lado, o carácter crónico da doença e o aumento progressivo e sustentável da morbilidade em indivíduos não tratados resulta numa diminuição da capacidade produtiva e sofrimento prolongado (Morel, 2000). Face a estas consequências o controlo da schistosomose torna-se imperioso. Porém, para que o controlo se possa realizar, num contexto integrado, é necessário conhecer onde se encontram os focos de infecção, isto é, habitats de água doce com moluscos infectados com *S. mansoni*, no caso da schistosomose intestinal. Contudo, para determinar se os moluscos se encontram infectados é de grande importância a detecção precoce (período pré patente) da infecção por *S. mansoni*. Devido às limitações dos métodos clássicos para detecção de *S. mansoni* no período pré patente, os métodos moleculares são vistos como possíveis alternativas para a detecção precoce desta infecção nos moluscos. Assim o presente estudo teve como:

### 2.1. Objectivo geral:

Detecção de *S. mansoni* no molusco *B. glabrata* durante período pré-patente, por NestedPCR.

### 2.2. Objectivos específicos:

- I. Detectar a presença do ADN de *S. mansoni* em *B. glabrata* durante o período pré-patente e verificar se a infecção do molusco depende da dose de miracídios e do tempo de exposição aos mesmos;
- II. Desenvolver uma técnica de PCR específica e sensível na detecção de *S. mansoni* em moluscos potenciais hospedeiros intermediários.

## CAPÍTULO III - MATERIAL E MÉTODOS

### 3. Material e Métodos

#### 3.1. Obtenção dos moluscos *B. glabrata*

As duas estirpes de *B. glabrata*, uma selvagem e outra albina, utilizadas neste estudo, são oriundas de Belo Horizonte- Brasil e mantidas no Laboratório de Malacologia da Unidade de Helminologia e Malacologia Médicas do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (I.H.M.T) durante varias gerações. Os moluscos seleccionados apresentavam de 8-10 milímetros de diâmetro. Foi utilizado um total de 90 exemplares (45 da estirpe albina e 45 da selvagem).

#### 3.2. Exposição de *B. glabrata* a *S. mansoni*

O ciclo de vida de *S. mansoni* é mantido no laboratório de Malacologia do IHMT, tendo como hospedeiro intermediário *B. glabrata* e hospedeiro definitivo *Mus musculus*. No presente estudo, a infecção experimental dos moluscos consistiu na exposição destes aos miracídios que eclodiram dos ovos de *S. mansoni* obtidos por infecção experimental de *Mus musculus*. A técnica utilizada para a obtenção dos ovos de *S. mansoni* foi realizada segundo o protocolo da UHMM/UPMM/IHMT, adaptado de Duvall, R.H.& Dewitt, W.B., 1967 (**Anexo 1**).

Para a infecção dos moluscos foram definidos dois grupos de *B. glabrata* de cada estirpe, (uma albina e uma selvagem), cada grupo foi formado com 45 exemplares. Cada molusco foi colocado num tubo de Wills contendo cerca de 15 ml de água, com temperatura entre 25 e 27°C, e expostos a um número de miracídios variável, de acordo com o plano de estudo (**Tabela 1**) durante um período de 18 hora. Para cada um destes grupos constituiu-se um grupo controlo, os quais não foram expostos a miracídios. Os moluscos expostos a um miracídio foram utilizados para validar a sensibilidade da técnica.

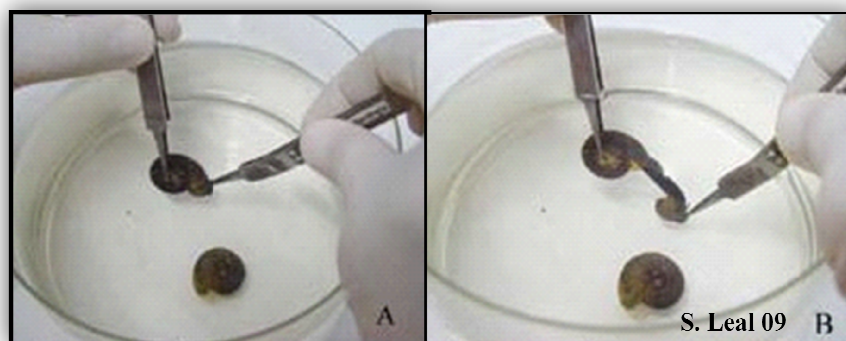
**Tabela 1: Plano de estudo utilizado para a exposição dos moluscos a miracídios de *S. mansoni*.**

Dias após a exposição a miracídios	Número de miracídios expostos			Total de molusco utilizados em cada estirpe
	Um	Cinco	Dez	
Um dia	5	5	5	15
Três dias	5	5	5	15
Setes dias	5	5	5	15

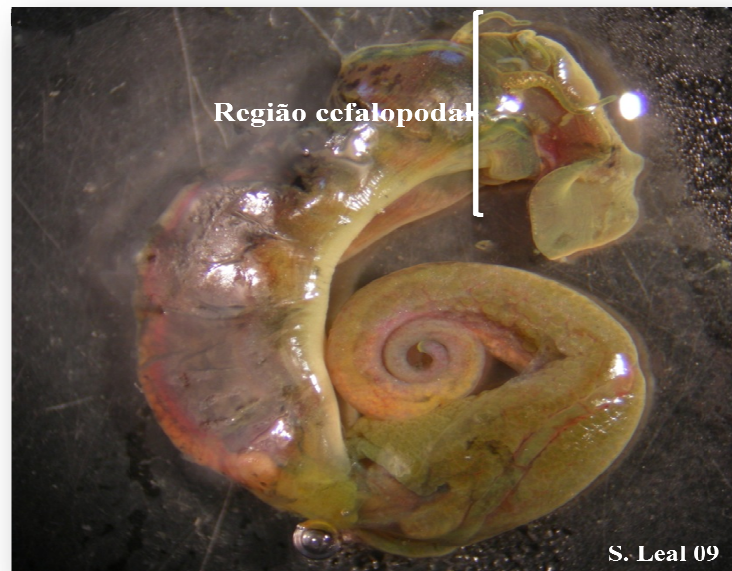
Após a exposição aos miracídios, os moluscos foram divididos em grupos segundo o plano de estudo e colocados em recipientes de plástico contendo aproximadamente 150 ml de água e alimentadas com alface fresca até serem sacrificadas.

### 3.3. Dissecção dos moluscos *B. glabrata*

A dissecção dos moluscos efectuou-se um dia, três e sete dias após a exposição aos miracídios de *S. mansoni*. Os moluscos foram mergulhados em banho maria a 70°C, durante 30 segundos. A extracção do corpo do molusco foi retirada com ajuda de duas pinças (**Figuras 9 A e B**).

**Figura 9:** Extracção do molusco da concha (Original de S. Leal)

Após a extracção do corpo do molusco cortou-se, com um bisturi, a região cefalopodal do molusco (**Figura 10**). Esta foi conservada num microtubo de “Eppendorf” contendo etanol a 100%, o qual foi guardado no frigorífico a 4°C até ao momento da extracção do ADN genómico.



**Figura10:** Corpo do molusco indicando a região cefalopodal (original de S. Leal)

### 3.4. Extracção do ADN genómico

#### 3.4.1. Extracção do ADN genómico de *B. glabrata*

A extracção de ADN genómico da *B. glabrata* foi realizada com base no método de Stothard (1996) com ligeiras modificações. A região cefalopodal de *B. glabrata* foi macerada e homogeneizada num tubo de “Eppendorf” contendo 600µL de tampão CTAB (“Cetyltrimethylammonium Bromide”) aquecido, ao qual se adicionaram 10µl de Proteinase K (para desproteinização). De seguida colocaram-se os tubos na estufa durante uma hora e trinta minutos a 65°C. No final deste tempo adicionaram-se 600µL de Clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), agitou-se por inversão durante dois minutos e centrifugou-se a 13000 rpm ( $\approx 23000$  rcf - “relative centrifugal force”) por alguns segundos.

O sobrenadante foi transferido para um tubo de “Eppendorf” contendo 800µL de etanol frio para a precipitação do ADN e em seguida centrifugou-se 20 minutos a 13000 rpm ( $\approx$ 23000 rcf). Rejeitou-se o sobrenadante e lavou-se o *pellet* obtido com 500µL de etanol a 70% e centrifugou-se 20 minutos a 13000 rpm ( $\approx$ 23000 rcf). Rejeitou-se o sobrenadante e secou-se o *pellet* obtido na estufa, para a vaporização total do etanol. Em seguida ressuspendeu o *pellet* seco em 50 µL do tampão TE (Tris EDTA, pH neutro), o qual foi guardado a -20°C até ser utilizado.

### 3.4.2. Extração do ADN genómico de *S. mansoni* adultos

Os vermes adultos utilizados na extração do ADN genómico do *S. mansoni*, foram utilizados como controlo positivo. Estes foram obtidos a partir do fígado de *Mus musculus* infectados com *S. mansoni* (estirpe de Belo Horizonte-Brasil, mantida na Unidade de Helminologia e Malacologia Médicas do IHMT). O método utilizado para a extração do ADN genómico do *S. mansoni* é o método de Stothard (1996), com ligeiras modificações. O procedimento é o idêntico ao que foi referido para extração do ADN genómico de *B. glabrata*.

### 3.5. Quantificação do ADN genómico

As amostras de ADN genómico de *S. mansoni* e *B. glabrata* foram analisadas por electroforese em gel de agarose a 1% em tampão TAE (40 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA, PH 8,0) contendo 8µL de brometo de etídio. A visualização do ADN fez-se no transiluminador (Alphaimager®HP, Alpha Innotech) com luz Ultra- Violeta (UV). A quantificação do ADN tem como finalidade verificar a integridade e qualidade da amostra.

### 3.6. Detecção de ADN de *S. mansoni* em *B. glabrata*

Foram aplicadas duas técnicas de PCR para a detecção de ADN de *S. mansoni*:

- PCR simples em que foram utilizados dois pares de oligonucleótidos, UNV16/Seq. 24 e Seq. 25/ Seq.26 (**Tabela 2**);
- Nested PCR (NPCR) em que as sequências UNV16 e Seq. 24 foram utilizados como oligonucleótidos externos e as sequências 25 e 26 foram utilizados como oligonucleótidos internos.

**Tabela 2 - Oligonucleótidos utilizados na amplificação do ADN dos moluscos *B. glabrata***

Oligonucleótidos	Sequências dos oligonucleótidos	Tamanho do pares de bases (pb)	Estrutura
UNV16	5'CCGGACATCTAAGGGCATCA3'	940 pb	Oligonucleótidos externos
SEQ_24	5'GTTACG ATC AGG ACC AGT GT3'		
SEQ_25	5'GTG CTG GTG GGT TGA CGA GTT C3'	720 pb	Oligonucleótidos internos
SEQ_26	5'CTA AAC GAG CAC AGA GGA C3'		

#### 3.6.1. PCR Simples

A reacção, foi realizada num microtubo (Illustra™ puReTaq Ready-To-Go PCR Beads) contendo Tap ADN Polimerase, ao qual foi adicionado 1 µL do oligonucleótidos UNVre16, 1µL do oligonucleotidoSEQ\_24, e 1,5µL da amostra de ADN e perpez-se o volume para 25µL com água bidestilada. Homogeneizou-se o conteúdo do tubo e colocou-se o termociclador (AVISO®, GmbH Mechatronic Systems).

Em cada reacção foi preparada um controlo negativo, com todos os reagentes referidos anteriormente excepto a amostra de ADN e um controlo positivo em que foi utilizada uma amostra do ADN genómico de *Schistosoma mansoni* adulto.

### 3.6.2. Nested PCR (NPCR)

#### 3.6.2.1. Reacção de NestedPCR em duas etapas

Foram utilizados dois pares de oligonucleótidos em duas reacções de PCR diferentes, num total de 60 ciclos (30 ciclos de cada).

Na primeira reacção PCR foi utilizado um par de oligonucleótidos externos, enquanto que na segunda reacção de PCR uma alíquota do produto amplificado da primeira reacção serviu como molde para uma nova amplificação utilizando um par de oligonucleótidos mais internos (**Tabela 2**) que se ligam a regiões mais internas da sequência de ADN produzida na primeira reacção de PCR. As reacções foram efectuados num microtubo (Illustra™ puReTaq Ready-To-Go PCR Beads) contendo Taq DNA Polimerase, no qual foram adicionados 0.5µL do oligonucleótido SEQ\_25, 0.5 µL do oligonucleotido SEQ\_26, e 2µL do produto do primeiro PCR perfazendo-se o volume para 25µL com água bidestilada. Homogeneizou-se o conteúdo do tubo e colocou-se no termociclador (AVISO®, GmbH Mechatronic Systems). Na primeira reacção de PCR as condições de amplificação estão descritas na **Tabela 3**, para a segunda reacção de PCR as condições de amplificação foram as mesmas descritas na **Tabela 3** excepto a temperatura de ligação que foi de 58°C durante 1 minuto.

Em cada reacção foi preparada um controlo negativo, com todos os reagentes referidos anteriormente excepto a amostra de ADN e um controlo positivo em que utilizou-se a amostra do ADN genómico de *S. mansoni* adulto.

**Tabela 3: Condições de amplificação das amostras por PCR**

<b>Etapas</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>	<b>Ciclos</b>
<b>Desnaturação inicial</b>	92°C	5 minutos	
<b>Desnaturação</b>	92°C	30 segundos	
<b>Ligação</b>	65°C	1 minuto	<b>30 Ciclos</b>
<b>Extensão</b>	75°C	1 minuto	
<b>Extensão final</b>	72°C	5 minutos	

### 3.7. Quantificação dos produtos de PCR amplificados

Os produtos de amplificação da reacção de PCR foram analisados por electroforese em gel de agarose (1%) em solução tampão TAE (40mM Tris-Acetato, 1mM EDTA; pH 8,0) contendo 8µL de brometo de etídio. A migração das moléculas de ADN foi avaliada por comparação com a de um marcador de peso molecular “HyperLadder II” (Bioline). As amostras foram preparadas com 3µL do produto de PCR ao qual foi adicionado 2µl tampão de deposição (Azul Bromofenol com glicerol). A electroforese foi realizada a 100V durante 40 minutos. Os fragmentos de ADN foram visualizados após a exposição a luz ultravioleta em transiluminador (Aphalmager®HP, Alpha Innotech).

### 3.8. Amplificação de *S. mansoni* adultos

Foi realizada por reacção de PCR aplicada a região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) dos operões do ADN ribossomal (rADN). Os fragmentos foram amplificados com os oligonucleótidos descritos por Kane & Rollinson (1924), encontram-se descritos na **Tabela 4**.

Tabela 4: Oligonucleótidos utilizados na amplificação da região do ITS do *S. mansoni*

Oligonucleótidos	Sequências dos oligonucleótidos	Gene a ser amplificado	Tamanho do fragmento em pares de bases (pb)
ETTS1	5'-TGCTTAAGTTCAGCGGGT3'	ITS	1000pb
ETTS2	5'-TAACAAGGTTTGC GTGGTGAA3'		

### 3.8.1- Reacção de PCR

A reacção, foi realizada num microtubo (Illustra™ puReTaq Ready-To-Go PCR Beads) contendo Tap DNA Polimerase, ao qual foram adicionados 1 µL do oligonucleótidos ETTS1 e o 1µL do oligonucleótidos ETTS2, e 3µL da amostra de ADN perfazendo-se o volume final para 25µL com água bidestilada. Homogeneizou-se o conteúdo do tubo e colocou-se o termociclador (AVISO®, GmbH Mechatronic Systems). Em cada reacção foi preparada um controlo negativo, com todos os reagentes referidos anteriormente excepto a amostra de ADN. As condições térmicas utilizadas para a amplificação fragmentos de ADN estão descritas na **Tabela 5**.

O produto da amplificação é analisado por electroforese em gel de agarose a 1%, e visualizado utilizando um transiluminador com luz ultra-violeta (UV).

Tabela 5: Condições de amplificação por PCR

Étapas	Temperatura	Tempo	Ciclos
<b>Desnaturação inicial</b>	94°C	5 minutos	
<b>Desnaturação</b>	95°C	15 segundos	
<b>Ligação</b>	58°C	30 segundos	<b>37Ciclos</b>
<b>Extensão</b>	72°C	1,5 minutos	
<b>Extensão final</b>	72°C	10 minutos	

### **3.9- Validação de sensibilidade da técnica**

Para a validação da sensibilidade da técnica foram utilizadas amostras de ADN genómico de moluscos não infectados e de moluscos infectados. Primeiro preparou-se uma mistura de ADN genómico dos moluscos não infectado, a partir desta mistura efectuaram-se diluições de 1:10, 1:30, 1:50 e 1:100 de uma amostra de ADN genómico de molusco exposto a um miracídio durante três dias. A amplificação do ADN foi realizada por PCR e NPCR nas mesmas condições descritas no ponto 1.7 do Capítulo I.

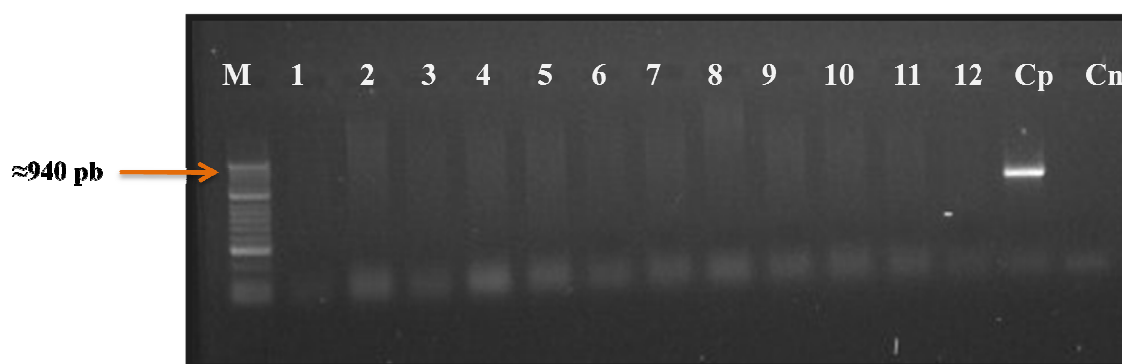
## CAPITULO IV - RESULTADOS

## 4. Resultados

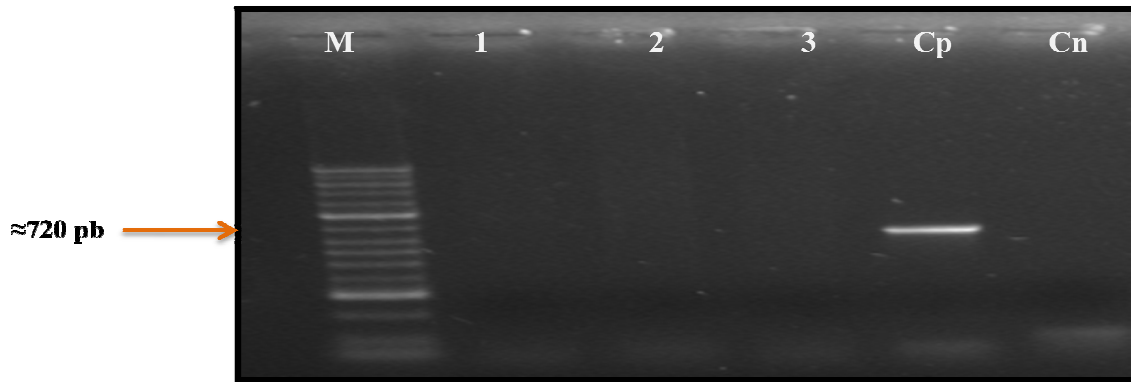
### 4.1. Determinação da especificidade das técnicas de detecção molecular (PCR, NPCR).

A análise da especificidade de cada técnica de PCR é indispensável, pois garantirá que só será amplificado o fragmento de ADN específico, diminuindo os riscos de resultados falso-positivos devido às amplificações cruzadas.

Na reacção de PCR em que foram utilizados os oligonucleótidos externos (SEQ\_24 e Unvre16) observou-se apenas a amplificação de um de fragmento com aproximadamente 940 pb (**Figura 11**), a qual corresponde ao controlo positivo ou seja ADN do *S. mansoni*. Na reacção em que se utilizaram os oligonucleótidos internos (SEQ\_25 e SEQ\_26) observou-se a amplificação de um fragmento com aproximadamente 720 pb (**Figura 12**), o qual corresponde também ao controlo positivo. Estes resultados demonstram assim a especificidade desses pares de oligonucleótidos.



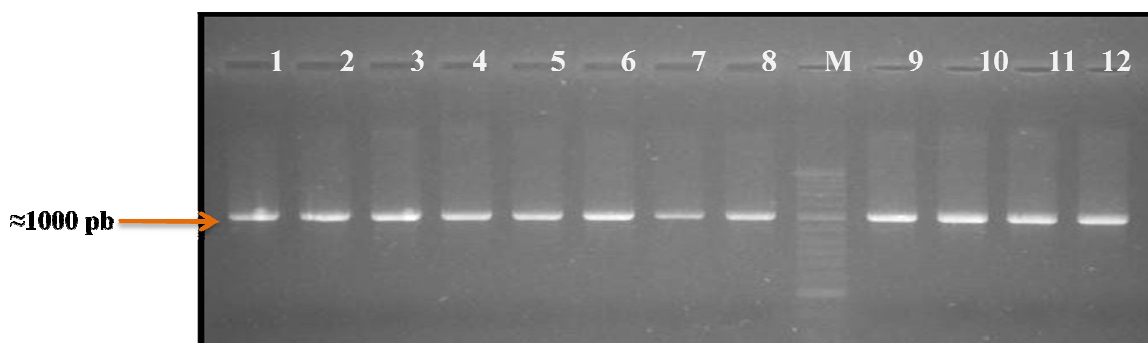
**Figura 11:** Especificidade de amplificação de PCR usando os oligonucleótidos Unvre16 e SEQ\_24. M- marcador de peso molecular; 1-12- *B. glabrata*; Cp (controlo positivo) - *S. mansoni* adulto, Cn- Controlo negativo.



**Figura 12:** Especificidade de amplificação de PCR usando os oligonucleótidos SEQ\_25 e SEQ\_26. M- marcador de peso molecular; 1-3- *B. glabrata*; Cp- (controlo positivo) *S. mansoni* adulto, Cn- Controlo negativo.

#### 4.2. Amplificação da Região Interna Transcrita (ITS) dos vermes adultos de *S. mansoni*

Para análise molecular dos vermes adultos de *S. mansoni*, procedeu-se a amplificação da Região ITS. Foi amplificado o ADN genómico de vários exemplares de *S. mansoni* tendo-se obtido um fragmento com aproximadamente 1000 pb (**Figura 13**).



**Figura 13:** Gel de agarose a 1% da amplificação da Região ITS do ADN de *S. mansoni*, M- marcador de peso molecular; 1 - 12- *S. mansoni*.

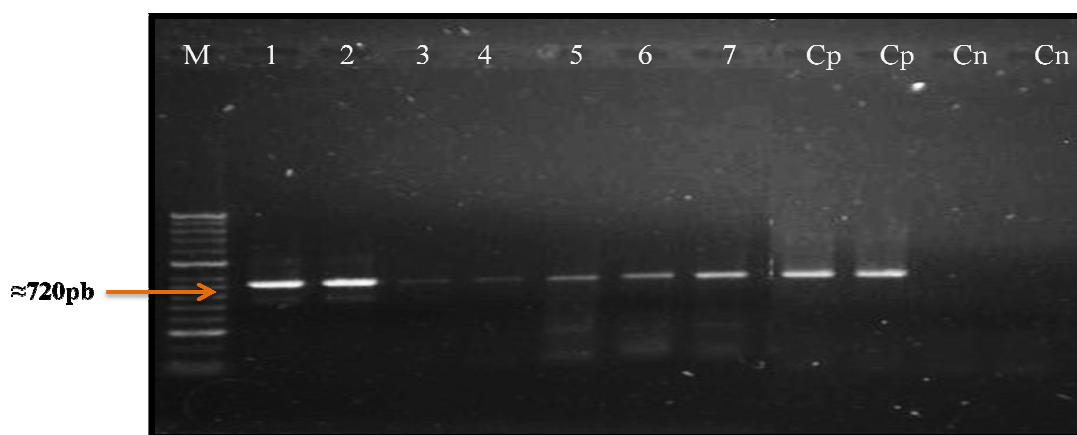
### 4.3. Identificação de infecção no molusco no período pré-patente por NestedPCR

Foram analisadas por NestedPCR um total de 90 amostras de ADN genómico de *B. glabrata* (45 estripe albina e 45 estripe selvagens). Destas amostras observou-se uma amplificação em 76% dos moluscos que foram expostos a um miracídio, 80% dos que foram expostos a cinco miracídios e 86,6% dos que foram expostos a dez miracídios. Todas apresentaram um fragmento de ADN com aproximadamente 720 pb o qual corresponde á amplificação do ADN do parasita em estudo. Estes resultados demonstram que a sensibilidade do NestedPCR é de 79,96% (**Tabela 6**).

**Tabela 6: Amostras de *B. glabrata* analisadas por NestedPCR**

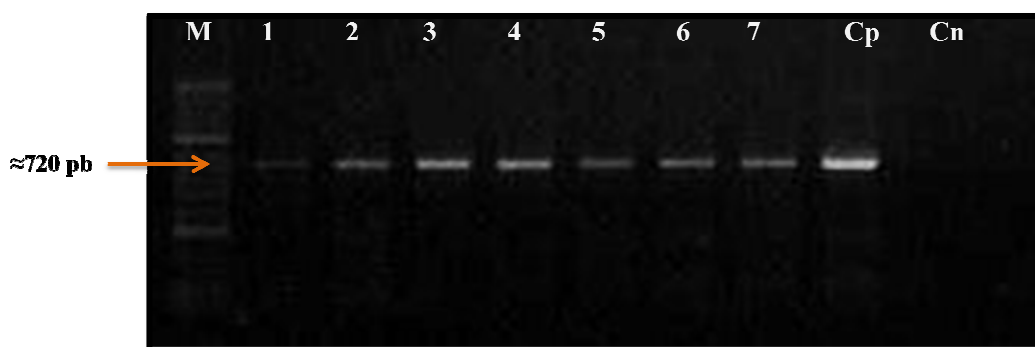
Método de Detecção	Número de miracídios	Total das amostras testadas	Total das amostras amplificadas	Percentagem (%) das amostras amplificadas
NestedPCR	Um	30	22	73,3
	Cinco	30	24	80
	Dez	30	26	86,6

Na **Figura 14**, pode-se observar a amplificação do *S. mansoni* por NPCR (NestedPCR), no molusco exposto a um miracídio, em diferentes períodos de tempo. Embora os períodos de exposição ao miracídio tenham sido diferentes, todas elas amplificaram com o mesmo número de pares de bases ( $\approx 720$  pb).



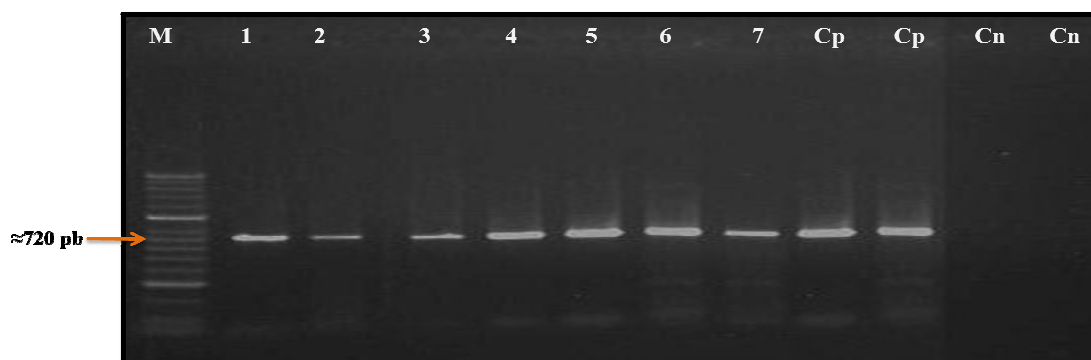
**Figura 14:** Gel de agarose a 1% das amostras de *B. glabrata*, expostas a um miracídio em diferentes períodos de tempo. M- marcador de peso molecular; 1- *B. glabrata* (albina), 2- *B. glabrata* (selvagem) com um dia de exposição; 3- *B. glabrata* (selvagem), 4- *B. glabrata* (albina) 5- *B. glabrata* (selvagem) com a três dias de exposição; 6- *B. glabrata* (selvagem), 7 *B. glabrata* (albina) com sete dias de exposição; Cp- Controlo positivo, Cn- Controlo negativo.

Na **Figura 15**, observa-se a amplificação do *S. mansoni* por NPCR (NestedPCR), no molusco exposto a cinco miracídios em diferentes períodos de tempo. Embora os períodos de exposição aos miracídios tenham sido iguais ao descrito anteriormente e o número de miracídios seja diferente, os resultados obtidos foram iguais aos anteriores, ou seja as amostras amplificaram com os mesmos pares de bases ( $\approx 720$  pb).



**Figura 15:** Gel de agarose a 1% das amostras de *B. glabrata*, expostas a cinco miracídios em diferentes períodos de tempo. M- marcador de peso molecular; 1- *B. glabrata* (albina), 2- *B. glabrata* (selvagem) com um dia de exposição; 3- *B. glabrata* (albina) 4- *B. glabrata* (selvagem) com a três dias de exposição; 5- *B. glabrata* (selvagem), 6 *B. glabrata* (albina), 7- *B. glabrata* (selvagem), - com sete dias de exposição; Cp- Controlo positivo, Cn- Controlo negativo.

Por outro lado, quando os moluscos são expostos a dez miracídios em diferentes etapas do período pré-patente os resultados obtidos são idênticos aos das etapas anteriores, em que houve uma amplificação das amostras com fragmento de  $\approx 720$ pb (**Figura 16**)

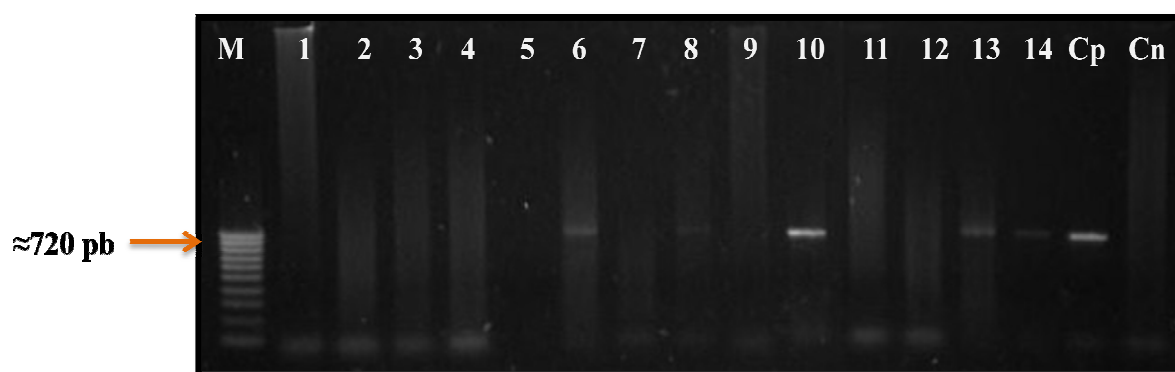


**Figura 16:** Gel de agarose a 1% das amostras de *B. glabrata*, expostas a dez miracídios em diferentes períodos de tempo. M- marcador de peso molecular 1- *B. glabrata* (selvagem), 2- *B. glabrata* (selvagem), 3- *B. glabrata* (albina) com um dia de exposição, 4- *B. glabrata* (selvagem) 5- *B. glabrata* (albina), 6- *B. glabrata* (selvagem) com a três dias de exposição; 7 *B. glabrata* (albina) com sete dias de exposição; Cp- Controlo positivo, Cn- Controlo negativo.

#### 4.4. Validação da sensibilidade da técnica

Para a validação da sensibilidade destas técnicas, as amostras de ADN dos moluscos expostos a um miracídio e em diferentes períodos de tempo (um dia, três e sete dias após exposição), foram utilizadas com diferentes concentrações.

Após a amplificação das reacções de diluições, observou-se a presença de fragmentos de ADN com aproximadamente 720pb nas amostras expostas a três dias (**Figura 17-** poço 6 a 9) e sete dias (**Figura 17-** poço 11 a 14), para as seguintes concentrações 1:10; 1:30; 1:50 e 1:100, respectivamente. O ADN genómico de *S. mansoni* com um dia após exposição não foi amplificado (**Figura 17-** poço 1 a 5).



**Figura 17:** Amostras de *B. glabrata*, submetidas a diluições (1:10; 1:30, 1:50 e 1:100 respectivamente). M- marcador de peso molecular; 1 a 5- amostras com um dia de exposição; 6 a 9- amostras com três dias de exposição; 10- amostra de *B. glabrata* infectada; 11 a 14- amostras com sete dias de exposição; Cp- Controlo positivo, Cn- Controlo negativo.

## CAPITULO V- DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

## 5- Discussão e Conclusões

### 5.1. Discussão

A PCR é uma técnica de amplificação extremamente sensível e específica capaz de detectar um único fragmento de ADN numa amostra, desde que pelo menos um dos extremos da sequência a ser amplificada seja conhecida e que o fragmento esteja presente na amostra a amplificar. A detecção de sequências específicas de ADN por PCR tem confirmado ser de extrema importância para a análise genética e diagnóstico de várias doenças infecciosas (ABATH *et al.*, 2006).

Técnicas convencionais utilizadas na detecção de infecções dos moluscos são simples mas consomem muito tempo (Melo *et al.*, 2006). Para além disso, as técnicas convencionais não detectam a infecção dos moluscos no período pré-patente, e não distinguem a infecção por *S. mansoni* de outros trematódes (Barbosa e Silva, 1992; Favre *et al.*, 1995; Melo *et al.*, 2006).

O presente estudo teve como objectivo desenvolver uma técnica molecular sensível e específica na detecção do *S. mansoni* em *B. glabrata* (estirpe albina e selvagem) em diferentes etapas do período pré-patente. As duas estirpes de *B. glabrata* foram analisadas individualmente, permitindo assim, avaliar a especificidade deste método.

Alguns autores, em estudos anteriores analisaram os moluscos em lotes, diminuindo o tempo e os custos necessários para o diagnóstico, permitindo deste modo que amostragem analisada fosse maior (Hamburger, 1998; Melo *et al.*, 2006).

Nos últimos anos, várias abordagens moleculares têm vindo a ser desenvolvidas no âmbito do diagnóstico molecular da schistosomose. Para a identificação de moluscos infectados, Jannotti-Passos *et al.* (1997) usaram a amplificação por PCR de repetições de mini-satélites do ADN mitocondrial de *S. mansoni* como alvo para a técnica de PCR Multiplex.

Outros estudos, utilizaram como alvo a região 18S do ADN ribossomal do *S. mansoni* em Nested PCR para o estudo de *B. alexandrina* (Hanelt *et al*, 1997). Em 1998, Hamburger *et al* desenvolveram uma reacção de PCR tendo como alvo, sequências altamente repetitivas *in tandem* do genoma do *S. mansoni* para identificar infecções pré-patentes (menos de 30 dias de infecção, período em que o molusco apesar de infectado, não liberta cercarias) em *B.glabrata*.

No estudo aqui apresentado e tendo por base o trabalho desenvolvido por Melo *et al*, (2006), dois pares de oligonucleótidos utilizados foram baseados em zonas altamente conservadas do *S. mansoni*, obtido através do alinhamento das sua sequências, no caso dos oligonucleótidos Unvre16 e SeQ\_24 (específicos para *S. mansoni*) e de um outro conjunto de várias sequências para diferente espécies de outros tremátodes (SEQ\_25 e SEQ\_26).

Os resultados obtidos mostraram que os dois pares de oligonucleótidos (um externo e outro interno) foram bastante específicos na detecção do ADN de *S. mansoni* em moluscos expostos a diferentes doses de miracídeos e em diferentes etapas do período pré-patente, reforçando os resultados obtidos por outros autores (Hamburger *et al*, 1998 e Melo *et al*, 2006).

Tudo indica que as amplificações observadas parecem resultar de uma selecção de sítios polimórficos das regiões do gene ITS do ADN ribossomal do *S. mansoni* (Hamburger *et al*, 1998).

Quanto à sensibilidade desta técnica podemos observar o seu elevado grau, quanto foi efectuado numa mistura de ADN de moluscos não exposto e exposto a um miracídeo do *S. mansoni* em diferentes etapas do período pré-patente, e a diferentes diluições. Das amostras em estudos apenas não foi possível observar qualquer tipo de reacção de amplificação de ADN nas amostras sujeitas a uma baixa diluição (1/10). Este resultado pode estar associado com a degradação das moléculas de ADN durante a extracção ou qualquer outro processamento ou ainda pela presença na própria amostra de ADN de substâncias que reduzem ou até mesmo impedem por completo a correcta amplificação da região alvo (Radström *et al.*, 2004 e Hanelt, *et al*, 1997).

Estes factores podem ser considerado importante para o período de monitorização em que a prevalência da infecção no molusco é muito baixa e onde apenas um pequeno número de moluscos infectados podem ser encontrados entre um enorme conjunto de moluscos não infectados, principalmente em zonas em que há possibilidade do surgimento de schistosomose. Podemos dizer que as técnicas aqui descritas são sensíveis e específicas e poderão ser usadas na detecção do ADN do *S.mansoni* em misturas de moluscos nomeadamente em zonas endémicas.

## 5.2. Conclusões

O presente trabalho procurava validar duas técnicas moleculares que poderão ser utilizadas como uma ferramenta útil na identificação de potências hospedeiros intermediários de *S. mansoni*.

Face aos resultados obtidos neste trabalho podemos concluir que:

- A identificação do ADN de *S. mansoni* no molusco no período pré-patente é possível com a utilização de técnicas moleculares como o NestedPCR.
- As técnicas utilizadas são altamente específicas e sensíveis na detecção do *S. mansoni* independentemente, da dose de miracídios a que foi exposto o molusco e o seu período pré-patente:
- Estas técnicas podem ser uma alternativa aos métodos convencionais para a identificação de infecções recentes por *Schistosoma mansoni* em zonas endémicas.

## CAPÍTULO VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ABATH, F.G., MELO, F.L., WERKHAUSER, R.P., MONTENEGRO, L., MONTENEGRO, R., SCHINDLER, H.C., 2002. Single-tube nested PCR using immobilized internal primers. *BioTechniques*, **33**, 1210 - 1214.

ADEMA, M. & LOKER, E.S., 1997. Specificity and Immunobiology of larval Digen-Snail Associations. In *Advances in Trematode biology*, eds. Bernard Fried e Thaddeus K. Graczyk, CRC Press: 229-263.

AZEVEDO, F. & MEDEIROS, 1955: FRAGA DE AZEVEDO, J. & MEDEIROS, L. C. M., 1995. "Estudos, ensaios e documentos. XIV. Os moluscos de águas doce do Ultramar Português. I. Introdução. Generalidades". Junta de Investigação do Ultramar, Lisboa, 95 pp.

BARBOSA, C. S.; SILVA, C. B., 1992. Epidemiologia da Esquistossomose Mansônica no Engenho Bela Rosa, Município de São Lourenço da Mata, Pernambuco, Brazil. *Caderno de Saúde Pública*. **8**: 83-87.

BARBOSA, F.S., 1962. Aspects of the ecology of the intermediate host of *Schistosoma mansoni* interfering with the transmission of Bilharziasis in North- Eastern Brazil. In "Bilharziasis"(G.E.W.Wolstenholme & M.O'Connor, eds), J.&A. Churchill, London.

BARBOSA, F.S. & OLIVIER, L., 1958. Studies on the snail vectors of Bilharziasis mansoni North-Eastern Brazil. *Bull Wld Hlth Org.*, **18**: 895-908.

BAYNE, C .J. & LOKER, E. S., 1987. *Survival within the snail host, in the Biology of Schistosomes*. From Genes to Latrines, Eds. D. Rollinson & A.J.C. Simpson, Academic Press, London: 321-346.

BERRIE, A. D., 1973. Snails, schistosomes and systematics; some problems concerning the genus *Bulinus*. In "Taxonomy and Ecology" (B. Dawes, ed.), Academic Press, New York and London, 173-188 pp.

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., 1994. "Freshwater snails of Africa and their Medical importance. (2nd Edition), Taylor & Francis, London, 487.

BRUMPT, E., 1940. Confirmation des observations de A. Lutz sur les lesion tentaculaires de *Planorbis glabratus* (= *P. guadaloupensis*) determines par l'evolution sur place des miracídios de *Schistosoma mansoni*. *C. R. Soc. Biol.* **133**(4): 625-628.

BUTTER, A., 1958. Le complexe "Mollusque- Schistosome" au Brésil. *Bull Wld Wlth Org.*, **18**: 909-929.

CALDEIRA ROBERTA L; JANNOTTI-PASSOS LIANA K; LIRA POLLANAH M; CARVALHO OMAR S., 2004. Diagnostic of *Biomphalaria* snails and *Schistosoma mansoni*: DNA obtained from traces of shell organic materials. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **99** (5): 499-502.

CALDEIRA RL, VIDIGAL TA, MATINELLA L, SIMPSON AJG & CARVALHO O.S., 2000. Study of planorbids from Venezuela by polymerase chain reaction amplification and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **95**:171-177.

CALDEIRA RL, VIDIGAL TA, PAULINELLI ST, SIMPSON AJG & CARVALHOS O. S., 1998. Molecular identification of similar species of the genus *Biomphalaria* (Mollusca: Planorbidae) determined by PCR-RFLP. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **93**:219-225.

COELHO, M. V., 1954. Ação das formas larvárias de *Schistosoma mansoni* sobre a reprodução de *Australorbis glabratus*. *Publ. Av. Inst. Aggeu Magalhães*, **3**(3): 39-54.

---

- CONNORS, V. A., BURO, I., JOURDANE, J., THÉRON, A., AGNER, A. & GRANATH, E.O., 1998. Recombinant Human Interleukin-1-Mediated Killing of *Schistosoma mansoni* primary sporocysts in *Biomphalaria glabrata*. *Journal of Parasitology*, **84** (5): 920-926.
- DEJONG, R., J., MORGAN, J.,A.,T. *et al.*, 2001. Evolutionary Relationships and Biogeography of *Biomphalaria* (Gastropoda: Planorbidae) with Implications Regarding Its Role as Host of the Human Bloodfluke, *Schistosoma mansoni*. *Molecular Biology and Evolution*, **18**:2225-2239.
- DESCHIENS, R., 1954. Incidence de la mineralisation de l'eau sur le mollusque vecteurs des bilharzioses. Conséquences pratiques. *Bull. Soc. Path. Exot.*, **47**:264-270.
- FARIA CASTRO, P., 2007, Vigilância e Controle de Moluscos de Importância Epidemiológica, 2ªed.editora do Ministério de Saúde, Brasília. 81-84 pp.
- FAVRE TC, BOGÉA T, ROTENBERG L, SILVA HS, PIERI OS., 1995. Cercarial emergence of *Schistosoma mansoni* from *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria straminea*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* , **90**: 565-567.
- FAUST, E.C., 1920. Pathological changes in the gastropod liver produced by fluke infection. *Jonhs Hopkins Hosp. Bull.*, **31**:79-84.
- FAUST, E.C. & HOFFMAN, W.A., 1934. Studies on Schistosomiasis mansoni in Puerto Rico. III Biological studies. 1. The extra-mammalian phases of the life cycle. *Puerto Rico J. Publ. Hlth. Trop. Med.*, **10**:1-97.
- FERREIRA, W., SOUSA, JOÃO CARLOS, F., 2002. Microbiologia vol.2. Lisboa: LIDEL-Edições Técnicas, Lda. 488 pp.
- GOLDMAN, M.A., LO VERDE, P.T., CHRISMAN, C.L., FRANKLIN, D.A., MATTEWES, F., PITCHFORD R.J AND RICHARDS, C.S., 1983. Nucleolar organizer regions in *Biomphalaria* and *Bulinus* snails. *Experientia*, **39**: 911-913.
-

GRASSE, P., 1968. Sous- classe dès Pulmonés. In “Traité de Zoologie – Mollusques Gastéropodes et Scaphopodes” (P. P. Grassé, ed.), V, Part. II: 1625-1654.

GUERREIRO, MARIA, G. S., 1993. *Género: Biomphalaria*, IHMT, UHMM, Lisboa. 4-67pp.

GRÁCIO, M.A.A., 2008. Sumário das aulas de Helminologia Médica II (Cursos de Mestrados em Parasitologia Médica).

GRÁCIO, M.A.A., NHAQUE, A.T., ROLLINSON, D., 1995. Schistosomiasis in Guinea Bissau. Science and Technology for Development, second programe. *Parasitology*. A: 239-247.

HAMBURGER J, HE- NA, XIN XY, RAMZY RM, JOURDANE J & RUPPEL A 1998. A polymerase chain reaction assay for detecting snails infected with bilharzias parasites (*Schistoma mansoni*) from very early prepatency. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **59**: 872-876.

HANELT, ADEMA CM, MANSOUR MH & LOKER ES , 1997. Detection of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria* using nested PCR. *The Journal of Parasitology*, **83** (2):387-394.

HARRY, H.V. & ALDRICH, D. V., 1958. The ecology of *Asutralorbis glabratus* in Puerto Rico. *Bull. Wld Hlth Org.*, **18**: 819-832

HYMAN, L.H., 1967. “The Invertebrates “, VI. Mollusca I. McGraw Hill, New York, 792.

IAROTSKI, L.S. & DAVIS. A., 1981. The schistosomiasis problem in the world: results of a WHO questionnaire survey. *Bulletin of the World Health Organization*, **59** (1): 115-127 .

JANNOTTI-PASSOS, L. K. et al. 2006. Multiplex PCR for both identification of Brazilian *Biomphalaria* species (Gastropoda: Planorbidae) and diagnosis of infection by *Schistosoma mansoni* (Trematoda: Schistosomatidae). *The Journal Parasitology*. **92**: 401 -403.

- JANOTTI-PASSOS, L.K., SOUZA, C., P., 2000. Susceptibility of *Biomphalaria tenagophila* and *Biomphalaria straminea* to *Schistosoma mansoni* infection detected by Low Stringency Polymerase reaction. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, **42** (5): 291-294.
- JANNOTTI-PASSOS, L.K., VIDIGAL, T.H.D.A., DIAS-NETO, E., PENA, S.D.J., SIMPSON, A.J.G., DUTRA, W.O., SOUZA, C.P., CARVALHO-PARRA, J.F., 1997. PCR amplification of the mitochondrial DNA minisatellite region to detect *Schistosoma mansoni* infection in *Biomphalaria glabrata* snails. *Parasitology*, **83**: 395-399.
- JORGENSEN, A., KRISTENSEN T., K., STOTHARD, J.R., 2007. Phylogeny and Biogeography of African *Biomphalaria* (Gastropoda: Planorbidae), with emphasis on endemic species of the great East African lakes. *Zoological Journal of the Linnean Society*, **151** (2): 337-349 (13).
- KANE, A. & ROLLINSON, D., 1994. Repetitive in the ribosomal DNA internal transcribed spacer of *Schistosoma haematobium*, *S. intercalatum* and *S. mattheii*. *Mol. Biol. Parasit.*, **63** (1). 153-156.
- KASPER, D.L., BRAUNWALD, E., FAUCI.A.S. HAUSER, S.L., LONGO, D.L., JAMESON, J.L. (2006). Harrison Manual de Medicina (16.<sup>a</sup>ed.)Madrid: McGraw-Hill. 678 pp.
- 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.
- LUTZ, A., 1919. *Schistosoma mansoni* and schistosomiasis observed in Brazil. *Mem. Inst. Osw. Cruz*, **11**: 121-155.
- MALEK, E.T.A., 1980. "Snail-transmitted parasitic diseases", **I**: 334.
-

MALEK, E.T.A. &CHENG, T.C., 1974.” Medical and Economic Malacology.” Academic Press, New York and London. 97-104 pp.

MALEK, E.T.A., 1969. Studies on “Tropicarbid” snails (*Biomphalaria*. Planorbidae) from the Caribbean and Gulf of Mexico areas, including the Southern United States. *Malacologia*, **7** (2-3):183-209.

MALEK, E.T.A., 1958. Distribution of the intermediate host of Bilharziasis in relation to hydrography. *Bull.WLD Hlth org.*, **18**:785-818.

MELO FL, GOMES ALG, BARBOSA CS, WERKHAUSER RP, ABATH FGC., 2006. Development of molecular approaches for the identification of transmission sites of schistosomiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **100** (3): 1049-1055.

MOREL, C., 2000. Editorial, *Acta Tropica*, **77** (1): 3-7.

NEVES, D. P., MELO, A., L., LINARDI, P.M. 2005. *Parasitologia Humana*, (11.<sup>a</sup>ed.), Rio de Janeiro: Atheneu. 194-212 pp.

NEWTON WL., 1952. The comparative tissue reaction of two strains of *Australorbis glabratus* to infection with *Schistosoma mansoni*. *J Parasitol* **38**: 362-366.

O.M.S./ W.H.O., 1967. “Lutte contre les Mollusque et prévention de la Bilharziose.”O.M.S., *Monograph.*, **50**: 1-282.

POINTIER, J.P., 1982. Étude de la croissance de *Biomphalaria glabrata* mollusque hôte intermediaire de la Schistosomose intestinal dans les forets merecageuses a Pterocarpus de Gadalupe (Antilles Francaises). *Malacologia*, **22** (1-2): 395-398.

PONTES, L.A., DIAS-NETO, E., RABELLO, A., 2002. Detection by Polymerase Chain Reaction of *Schistosoma mansoni* DNA in Human serum and feces. *Am. J. Trop: med: hyg.*, **66** (2): 157-162.

- RADSTROM, P., R. KNUTSSON, P. WOLFFS, M. LOVENKLEV, AND C. LOFSTROM. 2004. Pre-PCR processing: strategies to generate PCR-compatible samples. *Mol. Biotechnol.*, **26**:133-146.
- REY L. 2008. Parasitologia. 4ª Edição. Rio de Janeiro - RJ, Editora Guanabara Koogan, 456 pp.
- REY L. 1992. Bases da Parasitologia Médica. Rio de Janeiro - RJ, Editora Guanabara Koogan. 349 pp.
- ROMEIRO; L. & AGUIAR, H., 1954. A influência do teor em cálcio do criadouro sobre um planorbideo. Nota prévia. *Rev. Brasil. Malar. Doenças Trop.*, **6** (3): 433-439.
- SCHWETZ, J., 1951. Notes conchyliologiques et ecologiques sur les mollusques centro-africains vecteurs de Bilharziose. Première étude: Les Planorbes. *Ann. Soc. Roy. Zool. Belgique*, **82** (2): 353-377.
- 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** (4): 545-554.
- SOUZA, P., X., 2005. Nova Abordagem laboratorial na Investigação das Enteroparasitoses em Humanos. Dissertação de mestrado. Rio de Janeiro: Universidade Federal Fluminense, 30pp.
- THÉRON, 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. *Experimental Parasitology*, **85** (1): 1-9.
- VAN DER KNAAP, W.P.W & LOKER, E.S., 1990. Immune Mechanisms in Trematode-snail Interactions. *Parasitology Today*, **6**(6): 175-182.
- VIGIDAL, 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 Host of *Schistosoma mansoni*. *Men.Inst.Oswaldo Cruz*, **93** (Suppl.I): 103-110.
-

WRIGHT, C.A., 1962. The significance of infra-specific taxonomy in Bilharziasis. In “Bilharziasis”(G.E.W.Wolstenholme & M. O’Connor, eds), J.&A. Churchill, London, 103-120.

YUNG, E. & GUY+ENOR, E., 1920. Embranchement des Mollusque. In “ Traité de Zoologie des animaux invertébrés (Achordata)”. Ed. Atar. Paris, 421-483 pp.

ANEXOS

---

## Obtenção de isolados de *Schistosoma mansoni* segundo o protocolo da UHMM/UPMM/IHMT, adaptado de Duvall, R.H.& Dewitt, W.B., 1967.

### Material

- ✓ Balão de vidro com água morna (36°C)
- ✓ Seringa de insulina 1 mL com agulha
- ✓ Seringa de 10ml com agulha
- ✓ Líquido de perfusão Pentothal® de sódico (7,5g de NaCH<sub>3</sub>COONa, 8,5g NaCl e 1000 mL H<sub>2</sub>O destilada).
- ✓ Solução salina (1,75% NaCl)
- ✓ Copos cónicos 200ml com água
- ✓ Tesoura
- ✓ Trituradora
- ✓ Funil e gaze

### Perfusão do fígado

- ✚ Inoculam-se os murganhos intraperitonealmente com 0.4 mL de solução de Pentothal® de sódico;
- ✚ Após a morte do murganho, faz-se um corte transversal do abdómen e puxa-se a pele para cada extremidade;
- ✚ Repete-se o procedimento para abrir a cavidade abdominal;
- ✚ Remove-se o diafragma e parte a grelha costal anterior, com ajuda de uma tesoura;
- ✚ Lavam-se as vísceras do murganho em água tépida para remover as impurezas;
- ✚ Levanta-se o fígado, e com o bisel da agulha faz-se um corte na veia porta;
- ✚ Após o desvio do pulmão direito para o lado esquerdo, introduz-se a agulha na artéria aorta torácica e injecta-se cerca de 10 mL de líquido de perfusão;
- ✚ Lavam-se novamente as vísceras, para assegurar que não se perdem os parasitas;
- ✚ Por fim faz-se a dissecação do fígado, para recuperar os parasitas que ficaram retidos.

### **Recolha dos ovos**

- ✚ Triturar o fígado do murganho com uma varinha mágica em solução salina, para destruir aos tecidos hepáticos e se dar a libertação dos ovos;
- ✚ Filtra-se a suspensão com duas espessuras de gaze e deixa-se repousar durante 20 minutos a 4°C;
- ✚ Fazem-se várias lavagens com solução salina, por aspiração/sedimentação;
- ✚ Quando a solução ficar suficiente limpa, decanta-se a suspensão, guardando o sedimento;
- ✚ Filtra-se novamente a suspensão com duas camadas de gaze, adiciona-se igual volume de água morna e expõe-se a luz artificial. Ao atingir certas condições de temperatura, salinidade e luminosidade, os miracídios eclodem dos ovos.