

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

***Biomphalaria tenagophila guuibensis* (MOLLUSCA: PLANORBIDAE): avaliação da suscetibilidade a *Schistosoma mansoni* e do status de subespécie**

por

**Lidiane Bento Braga**

Belo Horizonte  
Fevereiro/2012

DISSERTAÇÃO MDIP-CPqRR L.B. BRAGA 2012

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

***Biomphalaria tenagophila guuibensis* (MOLLUSCA: PLANORBIDAE): avaliação da suscetibilidade a *Schistosoma mansoni* e do status de subespécie**

por

**Lidiane Bento Braga**

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

Orientação: Dra. Roberta Lima Caldeira  
Coorientação: Dra. Liana K. Jannotti-Passos e Dr. Omar dos Santos Carvalho

Belo Horizonte  
Fevereiro/2012

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

B813  
2012

**Braga, Lidiane Bento.**

***Biomphalaria tenagophila guaibensis*  
(MOLLUSCA: PLANORBIDAE): avaliação da  
suscetibilidade a *Schistosoma mansoni* de  
status de subespécie / Lidiane Bento Braga. –  
Belo Horizonte, 2012.**

XIV, 56 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f.: 60-70

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

**1. Esquistossomose mansoni/transmissão 2.  
*Schistosoma mansoni*/parasitologia 3.  
*Biomphalaria*/parasitologia 4. Hibridização  
Genética/genética I. Título. II. Caldeira, Roberta  
Lima (Orientação). III. Jannotti-Passos, Liana  
Konovaloff (Co-orientação) IV. Carvalho, Omar  
dos Santos (Co-orientação)**

CDD – 22. ed. – 616.963

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

***Biomphalaria tenagophila guaibensis* (MOLLUSCA: PLANORBIDAE): avaliação da suscetibilidade a *Schistosoma mansoni* e do status de subespécie**

por

**Lidiane Bento Braga**

**Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros**

Prof. Dr. Roberta Lima Caldeira (Presidente)

Prof. Dr. Paulo Marcos Zech Coelho

Prof. Dra. Sthefane D' Ávila

Suplente: Dra. Cristiane Lafetá Furtado de Mendonça

**Dissertação defendida e aprovada em 03/02/2012.**

*Dedico este trabalho ao meu pai, Arival Alves Braga, por todo seu esforço para que estudássemos, e a todos os meus antepassados que não tiveram essa maravilhosa oportunidade de que eu desfruto hoje. Dentro de mim, todos vocês podem se sentir realizados, hoje.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por todas as bênçãos em minha vida.

Agradeço a todos os meus antepassados, cada um deu uma contribuição muito especial para que eu estivesse aqui, hoje.

À minha mãezinha, pela vida e por ter me ensinado a sempre caminhar com amor. Um agradecimento muito especial ao meu saudoso paizinho, que sempre me incentivou a subir cada degrau com paciência e humildade e principalmente por nos incentivar incondicionalmente aos estudos: Muito obrigada!

Às minhas irmãs, pelo incentivo e pela paciência nessa jornada.

Agradeço ao Vinicius, amor da minha vida, por todo o carinho e apoio incondicional, principalmente por ter me acalmado nos momentos mais difíceis.

À minha orientadora, Dra. Roberta Lima Caldeira, pelos ensinamentos, amizade, confiança e por ser um exemplo como pessoa e profissional.

À Dra Liana Konovallof Jannotti Passos, minha co-orientadora, pelas valiosas sugestões e pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

Ao Dr. Omar dos Santos Carvalho, meu co-orientador, pelas sugestões, confiança e apoio.

Aos colegas do Moluscário pela compreensão das ausências e pelo apoio.

Aos colegas do Laboratório de Helmintologia e Malacologia Médica, por que foi aqui que aprendi a manusear todas as ferramentas de Biologia Molecular que usei no meu projeto. Um agradecimento em especial a Chryslaine e Camilla.

Agradeço a ajuda da minha amiga Raphaela que sempre me acompanhou nos experimentos e cuidou dos moluscos quando precisei.

Às minhas amigas Nara e Amanda pela ajuda.

À Pós-Graduação do Centro de Pesquisas René Rachou, pela disponibilidade deste curso.

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

Ao Centro de Pesquisas René Rachou pelo apoio financeiro e infra-estrutura.

A todos que não foram citados, mas que de alguma forma colaboraram para a realização deste projeto.

## Sumário

<b>Lista de Figuras</b> .....	<b>IX</b>
<b>Lista de Tabelas</b> .....	<b>X</b>
<b>Lista de Abreviaturas e Símbolos</b> .....	<b>XI</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>XIII</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>XIV</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
1.1 Aspectos gerais da esquistossomose.....	16
1.2 Moluscos do Gênero <i>Biomphalaria</i> .....	16
1.2.1 Aspectos da biologia reprodutiva dos moluscos do gênero <i>Biomphalaria</i> .....	17
1.3 Identificação morfológica e molecular dos moluscos do gênero <i>Biomphalaria</i> .....	18
1.3.1 Identificação morfológica e distribuição geográfica de <i>B. tenagophila</i> , <i>B. t. guaibensis</i> e <i>B. occidentalis</i> .....	19
1.3.2 Identificação molecular de <i>B. t. guaibensis</i> .....	22
1.4 Isolamento reprodutivo e cruzamentos .....	23
1.5 Suscetibilidade dos moluscos do gênero <i>Biomphalaria</i> a <i>S. mansoni</i> .....	24
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>27</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>29</b>
3.1 Objetivo Geral.....	30
3.2 Objetivos específicos .....	30
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	<b>31</b>
4.1 Moluscos.....	32
4.2 <i>Schistosoma mansoni</i> .....	32
4.3 Exposição de moluscos às diversas cepas de <i>Schistosoma mansoni</i> .....	32
4.3.1 Exame dos moluscos.....	33
4.3.2 Cálculo da taxa de infecção e de mortalidade .....	33
4.3.3 LS-PCR.....	34
4.4 Experimentos de cruzamento .....	34
4.4.1 Comprovação do cruzamento .....	35
4.4.2 Avaliação da direção da transferência dos espermatozoides .....	35
4.5 Extração de DNA .....	35
4.6 PCR específico direcionado para a região ITS- rDNA .....	36
4.7 PCR RFLP .....	36

4.8	Exposição dos moluscos das gerações F1 e F2 a <i>Schistosoma mansoni</i> .....	37
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>38</b>
5.1	Exposição individual de moluscos a <i>S. mansoni</i> .....	39
5.1.1	Exposição de <i>B. t. guaibensis</i> a 50 miracídios/molusco da cepa LE .....	39
5.1.2	Exposição de <i>B. t. guaibensis</i> a 100 miracídios/molusco da cepa LE .....	39
5.1.3	Exposição de <i>B. t. guaibensis</i> a 50 miracídios/molusco da cepa SJ .....	40
5.1.4	Exposição de <i>B. t. guaibensis</i> a 100 miracídios/molusco da cepa SJ .....	40
5.1.5	Exposição de <i>B. t. guaibensis</i> a 50 miracídios da cepa AL.....	41
5.1.6	Exposição de <i>B. t. guaibensis</i> a 100 miracídios/molusco da cepa AL .....	42
5.1.7	LS-PCR.....	42
5.2	Experimentos de cruzamento .....	44
5.2.1	Pareamento <i>Biomphalaria tenagophila guaibensis</i> x <i>Biomphalaria occidentalis</i> .....	44
5.2.2	Pareamento <i>Biomphalaria tenagophila guaibensis</i> x <i>Biomphalaria tenagophila</i> .....	45
5.3	Exposição dos moluscos F1 e F2 pigmentados resultantes dos cruzamentos <i>B. t. guaibensis</i> x <i>B. tenagophila</i> (albino) à cepa SJ de <i>S. mansoni</i> ....	48
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>50</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>58</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>60</b>

## Lista de Figuras

<b>Figura 1:</b> Distribuição geográfica de <i>Biomphalaria tenagophila</i> (Bt), <i>B. tenagophila guaibensis</i> (Btg) e <i>Biomphalaria occidentalis</i> (Boc) no Brasil e a distribuição da prevalência da esquistossomose. ....	22
<b>Figura 2:</b> Gel de poliacrilamida 6% com os perfis da PCR-RFLP, mostrando a digestão do rDNA ITS com a endonuclease <i>AluI</i> .....	23
<b>Figura 3:</b> Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata do DNA amplificado pela LS-PCR de exemplares de <i>Biomphalaria glabrata</i> , controles dos experimentos de <i>B. t. guaibensis</i> . ....	43
<b>Figura 4:</b> Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata do DNA amplificado pela LS-PCR de exemplares de <i>B. t. guaibensis</i> expostos a três cepas de <i>S. mansoni</i> com 50 e 100 miracídios/molusco.....	44
<b>Figura 5:</b> Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata com perfis da PCR-RFLP de F1 de <i>Biomphalaria tenagophila guaibensis</i> do pareamento com <i>Biomphalaria occidentalis</i> .....	45
<b>Figura 6:</b> Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata com perfis da PCR-RFLP de F1 de <i>Biomphalaria occidentalis</i> do pareamento com <i>Biomphalaria tenagophila guaibensis</i> . ....	45
<b>Figura 7:</b> Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata com perfis da PCR-RFLP de F1 de <i>Biomphalaria tenagophila</i> do pareamento com <i>Biomphalaria tenagophila guaibensis</i> . ....	46
<b>Figura 8:</b> Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata com perfis da PCR-RFLP de F1 de <i>Biomphalaria tenagophila</i> do pareamento com <i>Biomphalaria tenagophila guaibensis</i> .....	47
<b>Figura 9:</b> Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata com perfis da PCR-RFLP de F1 de <i>Biomphalaria tenagophila guaibensis</i> do pareamento com <i>Biomphalaria tenagophila</i> . ....	47
<b>Figura 10:</b> Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata com perfis de <i>B. glabrata</i> controles positivos de F1 e F2 pigmentados de <i>B. tenagophila</i> albino, expostos a 100 miracídios/moluscos da cepa SJ, submetidos a LS-PCR.....	49

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1:</b> Molusco, quantidade, diâmetro e número de miracídios/molusco utilizados no experimento de exposição individual de <i>Biomphalaria</i> a <i>S. mansoni</i> (cepas LE, SJ e AL).....	33
<b>Tabela 2:</b> Resultado da exposição de <i>B. t. guaibensis</i> a 50 e 100 miracídios/molusco à cepa LE de <i>S. mansoni</i> .....	40
<b>Tabela 3:</b> Resultado da exposição de <i>B. t. guaibensis</i> a 50 e 100 miracídios/molusco da cepa SJ de <i>S. mansoni</i> .....	41
<b>Tabela 4:</b> Resultado da exposição de <i>B. t. guaibensis</i> a 50 e 100 miracídios/molusco da cepa AL de <i>S. mansoni</i> .....	42
<b>Tabela 5:</b> Exposição dos moluscos F1 e F2 pigmentados <i>B. t. guaibensis</i> de <i>B. tenagophila</i> albino a 100 miracídios/molusco da cepa SJ de <i>S. mansoni</i> .....	48

## Lista de Abreviaturas e Símbolos

% Por cento

°C graus Celcius

**AL** cepa *S. mansoni* isolada de moluscos de Alagoas

**µg** Micrograma

**µL** Microlitro

**µM** Micromolar

**16S** Subunidade menor do RNA ribossomal, subunidade 16

**18S** Subunidade menor do RNA ribossomal, subunidade 18

**26S** Subunidade menor do RNA ribossomal, subunidade 26

**28S** Subunidade menor do RNA ribossomal, subunidade 28

**Cm** centímetro

**dNTP** deoxinucleotídeo trifosfato

**EF** iniciador 5' - GGTTTCTTAGTGTTATAGCC

**ER** iniciador 5' - ACCTACCGTACTATGACG

**F1** Primeira geração de descendentes

**F2** Segunda geração de descendentes

**HCl** ácido clorídrico

**ITS1** Internal transcribed spacer1; (espaçadores transcritos internos 1)

**ITS2** internal transcribed spacer2; (espaçadores transcritos internos 2)

**ITS-rDNA** ribossomal internal transcribed spacer (espaçadores transcritos internos de ácido desoxirribonucleico ribossomal)

**KCl** cloreto de potássio

**LE** cepa de *S. mansoni* isolada de um paciente cujas letras representam as iniciais do seu nome

**LS-PCR** low stringency polymerase chain reaction (PCR de baixa estringência)

**M** molar

**MgCl<sub>2</sub>** cloreto de magnésio

**min** minutos

**ml** mililitro

**Mm** milímetro

**mM** milimolar

**PCR** polymerase chain reaction (reação em cadeia da polimerase)

**PH** potencial hidrogeniônico

**Pmoles** *picomoles*

**rDNA** ácido desoxirribonucleico ribossomal

**RFLP** Restriction Fragment Length Polymorphism

**RNA** ácido ribonucléico

**RPM** Rotação por minuto

**SJ** cepa *S. mansoni* isolada de moluscos de São José dos Campos

**U** unidades

## Resumo

O registro da única subespécie do gênero *Biomphalaria* no Brasil, *Biomphalaria tenagophila guaibensis*, foi realizado no sul do país por Paraense (1984). A subespécie foi assim classificada devido a similaridades morfológicas com *Biomphalaria tenagophila*, especialmente pela presença de uma bolsa vaginal. Esta característica é a principal diferença que distingue esta subespécie de *Biomphalaria occidentalis*, espécie com a qual apresenta, também, grandes semelhanças. Informações sobre esta subespécie são escassas, inexistem dados de cruzamento de *B. t. guaibensis* com *B. tenagophila* e com *B. occidentalis* e há apenas um experimento demonstrando que esta subespécie não infectou-se quando exposta a cinco miracídios/molusco da cepa SJ de *Schistosoma mansoni*. Estas lacunas geram dúvidas quanto à classificação taxonômica da subespécie, uma vez que estudos de relação filogenética demonstram uma afinidade maior de *B. t. guaibensis* e *B. occidentalis* do que com *B. tenagophila*. No intuito de ampliar os conhecimentos sobre esta subespécie, esta dissertação teve como objetivos 1) investigar possível cruzamento com as duas espécies crípticas, utilizando o caráter de albinismo e a técnica molecular de PCR-RFLP; 2) verificar a sua suscetibilidade a *S. mansoni*, com três diferentes cepas AL, SJ, e LE e 50 e 100 miracídios/molusco e 3) verificar a suscetibilidade dos moluscos F1 e F2 de possíveis cruzamentos. No cruzamento *B. t. guaibensis* X *B. tenagophila* albino, quatro albinos (27%) geraram F1 pigmentada, e o perfil molecular obtido foi de *B. t. guaibensis*, enquanto *B. t. guaibensis* x *B. occidentalis* não apresentaram evidências de cruzamento. Nos experimentos de exposição a *S. mansoni*, os moluscos *B. t. guaibensis* e os moluscos pigmentados F1 e F2 de *B. tenagophila* albino resultantes do cruzamento com *B. t. guaibensis* não se infectaram. Esses dados têm importância epidemiológica, uma vez que, afasta a possibilidade de focos da esquistossomose em regiões onde somente essa subespécie está presente. E ainda, foi demonstrado que o posicionamento de *B. t. guaibensis* como subespécie é válido, uma vez que houve cruzamento comprovado entre a *B. t. guaibensis* e a espécie *B. tenagophila*, e que, há isolamento reprodutivo entre *B. t. guaibensis* e *B. occidentalis*.

## Abstract

The registration of a single subspecies of the genus *Biomphalaria* in Brazil, *Biomphalaria tenagophila guaibensis*, was carried out in the south of the country by Paraense (1984). The subspecies was classified this way because of morphological similarities with *Biomphalaria tenagophila*, especially by the presence of a vaginal pouch. This feature is the main difference that distinguishes that subspecies of *Biomphalaria occidentalis*, a species with which also presents strong similarities. Information about this subspecies are scarce, there are no data crossing *B. t. guaibensis* with *B. tenagophila* and with *B. occidentalis* and there is only one experiment demonstrating that this subspecies is not infected when exposed to five miracidia/ mollusk of SJ strain of *Schistosoma mansoni*. These gaps create doubts about the taxonomy classification of subspecies, since studies of phylogenetic relationship show higher affinity of *B. t. guaibensis* with *B. occidentalis* than with *B. tenagophila*. In order to expand knowledge about this subspecies, this work aimed 1) to investigate possible crosses between the two cryptic species, using the character of albinism and the molecular technique of PCR-RFLP; 2) to verify their susceptibility to *S. mansoni*, with three different strains AL, SJ, and LE 50 and 100 miracidia/ mollusk and 3) verify the susceptibility of mollusks F1 and F2 of possible crosses. At the crosses *B. t. guaibensis* X *B. tenagophila albino*, four albino (27%) generated pigmented F1, and the molecular profile obtained was from *B. t. guaibensis*, while *B. t. guaibensis* x *B. occidentalis* showed no evidence of interbreeding. In the experiments of exposure to *S. mansoni*, the *B. t. guaibensis* mollusks and the pigmented mollusks F1 and F2 of *B. tenagophila albino* resulting from crosses with *B. t. guaibensis* didn't become infected. These data have epidemiological importance, since it removes the possibility of outbreaks of schistosomiasis in areas where only this subspecies is present. Furthermore, it was demonstrated that the positioning of subspecies *B. t. guaibensis* as valid, since there was shown the crosses between *B. t. guaibensis* and the species *B. tenagophila*, and there is reproductive isolation between *B. t. guaibensis* and *B. occidentalis*.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Aspectos gerais da esquistossomose

Esquistossomoses são infecções parasitárias causadas por helmintos da classe Trematoda. Ao redor do mundo, mais de 600 milhões de pessoas estão em risco de contrair esquistossomoses e aproximadamente 200 milhões estão infectadas (WHO, 2005). As esquistossomoses são endemias que ocorrem em 76 países e territórios, pertencentes à América do Sul, Ásia e África. *Schistosoma mansoni* (Sambon 1907) é o agente etiológico da esquistossomose mansoni, que no Brasil infecta aproximadamente seis milhões de pessoas e há 25 milhões em risco de contrair essa parasitose (WHO, 2008). O fato dessa parasitose ser negligenciada por autoridades políticas (Watts, 2008) constitui forte incentivo para estudos de vários aspectos da sua epidemiologia e controle (Rollinson & Simpson, 1987).

*Schistosoma mansoni* apresenta um ciclo biológico complexo, pois envolve um hospedeiro definitivo e um intermediário. No hospedeiro definitivo, mamíferos, ocorre a reprodução sexuada e no hospedeiro intermediário, moluscos do gênero *Biomphalaria*, a reprodução assexuada. Estudos em hospedeiros intermediários são relevantes uma vez que permitem interpretar o papel destes moluscos na epidemiologia da esquistossomose mansoni e subsidiar os serviços de saúde na tomada de decisões sobre medidas de controle a serem implementadas em diferentes regiões.

## 1.2 Moluscos do Gênero *Biomphalaria*

As espécies do gênero *Biomphalaria* encontram-se no filo Mollusca, classe Gastropoda, subclasse Pulmonata, ordem Basommatophora e família Planorbidae.

Os moluscos do gênero *Biomphalaria* foram caracterizados pela sistemática morfológica (Preston, 1910). Caracterizam-se por apresentarem concha em disco bicôncavo planispiral, com lados aproximadamente paralelos; última volta muito larga; umbigo aberto, porém superficial, orifícios genitais localizados do lado esquerdo do corpo. O termo *Biomphalaria* vem do latim *bis*: duas vezes + do grego *omphalos*: umbigo, em referência ao aprofundamento do giro central em ambos os lados da concha. A abertura da concha varia de acordo com a espécie e os giros são esculpidos apenas com estrias de crescimento (Paraense, 1975).

No território brasileiro foram registradas, até o momento, onze espécies e uma subespécie de moluscos do gênero *Biomphalaria*: *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818); *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835); *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1948); *Biomphalaria peregrina* (Orbigny, 1835); *Biomphalaria schrammi* (Crosse,

1864); *Biomphalaria kuhniana* (Clessin, 1883); *Biomphalaria intermedia* (Paraense & Deslandes 1962); *Biomphalaria amazonica* Paraense, 1966; *Biomphalaria cousini* (Paraense, 1966); *Biomphalaria oligoza* Paraense, 1974; *Biomphalaria occidentalis* Paraense, 1981 e *Biomphalaria tenagophila guaibensis* Paraense, 1984.

A grande responsável pela manutenção e disseminação do *S. mansoni*, no Brasil, é sem dúvida, *B. glabrata*, por se mostrar altamente suscetível, em decorrência da compatibilidade entre parasito-hospedeiro, e de sua larga distribuição. *Biomphalaria straminea* e *B. tenagophila* também são encontradas naturalmente infectadas pelo trematódeo. A infecção experimental em *B. peregrina*, *B. amazonica* e *B. cousini* aponta para o potencial dessas espécies em se tornarem hospedeiras intermediárias do trematódeo (Corrêa & Paraense 1971; Paraense & Corrêa 1973; Teodoro *et al.*, 2010).

### **1.2.1 Aspectos da biologia reprodutiva dos moluscos do gênero *Biomphalaria***

Moluscos *Biomphalaria* são dotados de grande capacidade de adaptação a diversos tipos de coleções hídricas e com amplitude de distribuição geográfica típica das espécies dotadas de boa plasticidade biológica (Paraense, 1970). Assim, quando as condições do meio se tornam desfavoráveis, esses moluscos podem contar com peculiaridades que vão desde sua capacidade de enterramento, resistência à dessecação até o grande potencial reprodutivo (por autofecundação ou fecundação cruzada). Esses fatores determinam um rápido repovoamento dos criadouros, promovendo a manutenção da população local (Paraense & Deslandes, 1955a).

No que diz respeito ao aspecto reprodutivo dos moluscos, planorbídeos são hermafroditas, como os demais pulmonados (Larambergue, 1939 e Paraense & Correa, 1988), realizando tanto a autofecundação como a fecundação cruzada. A análise de desovas de moluscos albinos, coletadas no campo, revela, em sua maioria, descendentes pigmentados, o que nos leva a concluir que, nas condições naturais, existe preferência pela fecundação cruzada (Paraense, 1955). Estes dados foram confirmados mais tarde para *Biomphalaria glabrata*, quando ficou demonstrado que mais de 90% dos descendentes de albinos são pigmentados (Vianey-Liaud *et al.*, 1991). Esse fluxo de genes entre dois moluscos de mesma espécie garante a variabilidade dentro da espécie e assegura a própria preservação (Paraense, 1956).

Depois da maturidade sexual, ovos e espermatozoides são formados no ovotéstis e liberados para o lúmen daquele órgão, e ambos viajam juntos ao longo do ducto hermafrodita. O auto-espermatozoide é estocado na vesícula seminal, e esse esperma acumulado será ejaculado através do canal hermafrodita. Estudos em *B. glabrata* já demonstraram que quando o auto-espermatozoide chega à vesícula seminal, são necessárias duas semanas para sua maturação e fertilização dos pares (Vianey-Liaud *et al.*, 1991), enquanto alospermas (espermas da fecundação cruzada) chegam maduros e conseguem imediatamente fertilizar o par (Jarne *et al.*, 2011). Paraense (1976) demonstrou, em moluscos *B. glabrata*, que somente pequena parte do alosperma migra pelo canal feminino; o restante é destruído na espermateca. Além disso, o alosperma acumula-se no ovotéstis, onde é estocado por vários meses. Esse autor deduziu que os cruzamentos ocorrem no ovotéstis e a autofecundação na vesícula seminal, e que os espermatozoides não se misturam e deve haver um fator diferenciador de ambos.

A ovoposição é geralmente noturna, sendo a massa de ovos depositada sob qualquer suporte sólido submerso, tais como folhas, plantas, pedras, conchas de outros planorbídeos, entre outros. A massa de ovos enrijece lentamente em contato com a água, apresentando, em menos de meia hora, aspecto de um disco elíptico, transparente, firme, porém flexível (Paraense, 1970).

### **1.3 Identificação morfológica e molecular dos moluscos do gênero *Biomphalaria***

Um dos aspectos importantes para implantação e direcionamento de ações de vigilância epidemiológica é a correta identificação das espécies de *Biomphalaria* presentes nas áreas de transmissão de esquistossomose, focos isolados ou em áreas potencialmente favoráveis ao estabelecimento da doença.

Para identificação das espécies brasileiras de *Biomphalaria*, Paraense (1975, 1981, 1984, 1988) utilizou os caracteres morfológicos da concha e dos sistemas genital e renal. A reprodutibilidade das técnicas morfológicas, em alguns casos, é discutida devido à similaridade fenotípica entre espécies do gênero, quantidade insuficiente de moluscos coletados e inadequados procedimentos de fixação (Paraense, 1975). Um exemplo claro, foi a descrição, após estudos moleculares, da ocorrência de *B. cousini* no Brasil (Caldeira *et al.*, 2010), anteriormente confundida com *B. amazonica* pelas semelhanças morfológicas, e com registro apenas em sua localidade tipo – Equador (Paraense 1966).

A combinação de métodos moleculares e morfológicos demonstra vantagens para uma correta sistemática, promovendo complementação dos dados e tornando-os mais confiáveis (Hillis, 1987). De fato, o renomado malacologista brasileiro Wladimir Lobato Paraense enfatiza que tanto a taxonomia morfológica quanto a molecular, desde que corretamente aplicadas, atingem satisfatoriamente o mesmo objetivo (Paraense, 2003). A vantagem da abordagem molecular é sanar problemas antes considerados insolúveis pela metodologia tradicional, sobretudo quando apenas conchas ou moluscos mortos eram disponíveis (Caldeira *et al.*, 2004)

Estudos com moluscos *Biomphalaria* utilizaram técnicas de isoenzimas (Mascara & Morgante, 1995; Paraense *et al.*, 1992) e RFLP (Knight *et al.*, 1991), entretanto as possibilidades oferecidas pelo desenvolvimento da reação em cadeia da polimerase – PCR (Saiki *et al.*, 1985) contribuíram de maneira expressiva para incrementar o conhecimento taxonômico deste gênero. Na verdade três genes do RNA ribossomal são organizados em um grupo que incluem um gene da pequena subunidade (16S para 18S), um gene da grande subunidade (26S para 28S) e o gene 5.8S. Em adição, dois espaçadores transcritos internos, ITS1 e ITS2, encontram-se entre estes genes com um espaçador transcrito externo, ETS, na 5' final do RNA transcrito. Análises comparativas das sequências nucleotídicas do gene do RNA ribossomal e suas regiões espaçadoras são informativas em estudos filogenéticos, uma vez que existem regiões que sofrem taxas evolutivas distintas. Em geral, as regiões espaçadoras só não são mais conservadas que os genes, sendo que algumas (ITS1 e ITS2) vêm sendo utilizadas em estudos de relacionamentos filogenéticos entre taxa, que apresentaram divergências nos últimos cinquenta milhões de anos. Além disso, as variações nas regiões espaçadoras (ITS1 e ITS2) têm sido utilizadas para identificar espécies ou cepas, sendo um bom marcador em estudos de genética de população (Palumbi, 1996).

### **1.3.1 Identificação morfológica e distribuição geográfica de *B. tenagophila*, *B. t. guaibensis* e *B. occidentalis***

Paraense (1984), quando descreveu a subespécie, *B. t. guaibensis*, realizou comparação com *B. tenagophila* e com *B. occidentalis*, concluindo que as três são indistinguíveis pela morfologia das conchas, sendo diferenciadas por sutis peculiaridades, presentes nos órgãos do sistema genital, o que dificulta a identificação morfológica.

*Biomphalaria tenagophila* foi descrita originalmente na província de Corrientes, na Argentina (Orbigny, 1835), e ocupa vasta região geográfica na América do Sul (Paraense, 1984), sendo encontrada no Peru, Paraguai, Uruguai e no Brasil. Nesse último, nos estados: Bahia, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Paraense, 1981; Paraense, 1972; Paraense, 1986). Apresentam conchas com até 35 mm de diâmetro e 11 mm de largura; sete a oito giros, carena (angulação longitudinal na lateral da concha) em ambos os lados, sendo mais acentuada à esquerda. Lado esquerdo geralmente mais côncavo que o direito. A presença da carena normalmente é vista nesta espécie, porém podem ser encontradas variações anatômicas que impedem que esta característica seja considerada preponderante na distinção de outras espécies. Superfície ventral do tubo renal lisa, sem crista. Parede ventral da vagina expandida em bolsa bem delimitada. Espermateca ovóide ou claviforme; duto quando bem delimitado, quase sempre um pouco mais curto que o corpo. Bainha do pênis relativamente delgada, porção média aproximadamente do mesmo diâmetro que a porção mais larga do canal deferente (Paraense, 1975).

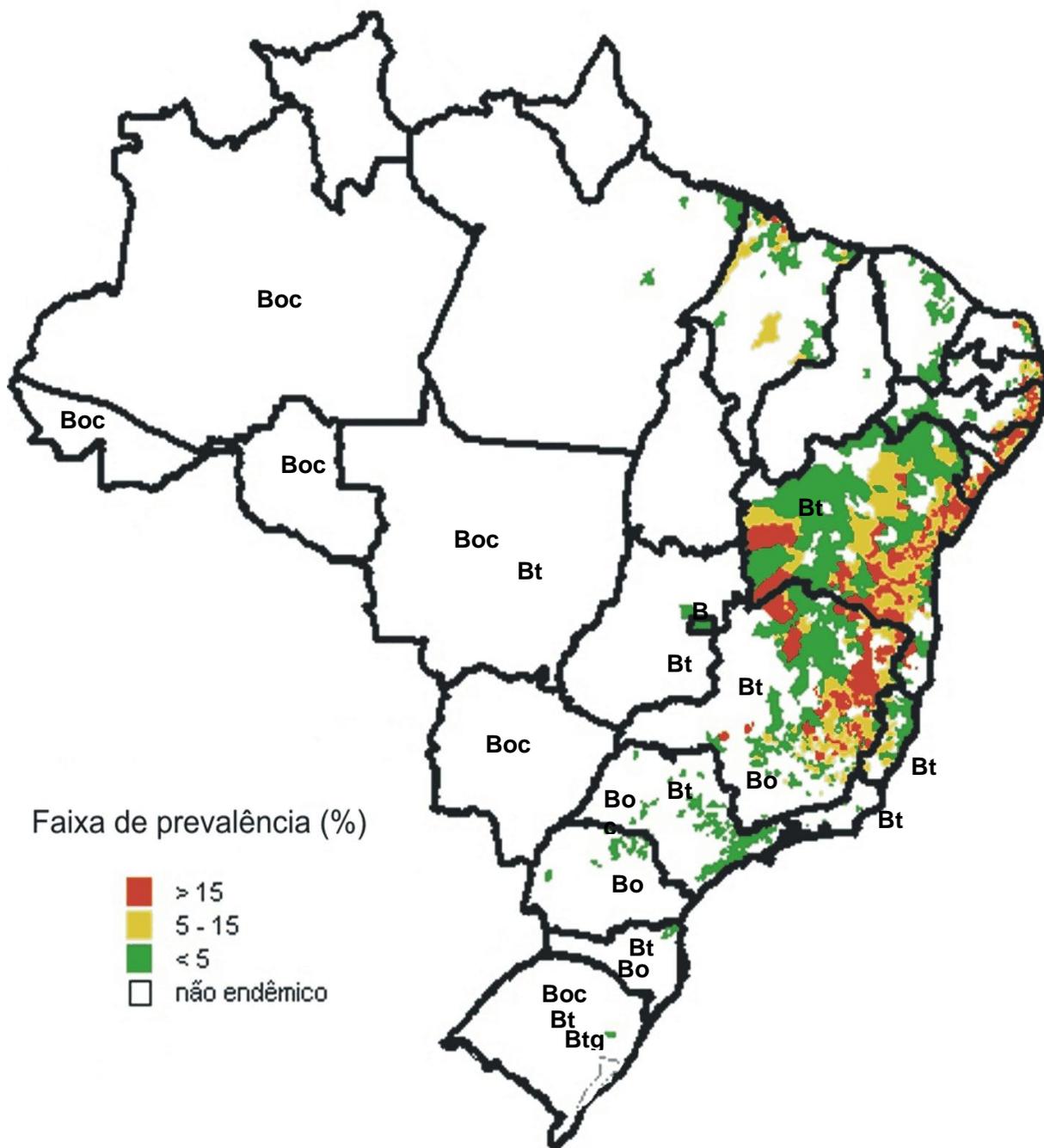
A subespécie *Biomphalaria tenagophila guaibensis* (Paraense 1984), foi assim denominada por ter sido encontrada no município de Guaíba, no estado do Rio Grande do Sul (RS). Desde sua a descrição até os dias de hoje, a subespécie tem sido reportada no RS e na parte média do Uruguai (Paraense, 1984; Pepe *et al.*, 2009). Para classificação de *B. t. guaibensis* como subespécie, Paraense (1984) utilizou o conceito de população local restrita geograficamente, que apesar de apresentar características morfológicas da espécie nominativa, difere taxonomicamente de outras subdivisões de uma espécie (Mayr *et al.*, 1953 Apud Paraense 1984). Possui concha com seis giros, com tamanho de até 21 mm de diâmetro e até 7,5 mm de largura. O último giro apresenta uma carena, mais acentuada no lado esquerdo. A superfície ventral do tubo renal é lisa e sem crista. Parede vaginal com bolsa bem delimitada. Espermateca ovóide ou claviforme. Prepúcio pelo menos duas vezes maior que a bainha do pênis. Apresenta concha e órgãos do sistema genital semelhante à espécie nominativa, *B. tenagophila*. Distingue desta pelo aspecto do complexo peniano (prepúcio mais longo e proporcionalmente mais delgado em *B. t. guaibensis*), pela razão entre os comprimentos da bainha do pênis e do prepúcio, pela razão entre os comprimentos do complexo uterino e do complexo peniano, e por um coeficiente de diferença de

2,44 para a razão entre bainha do pênis e prepúcio e de 2,02 para a razão entre o complexo uterino e o complexo peniano (Paraense, 1984)

*Biomphalaria occidentalis* (Paraense, 1981) já foi registrada no Brasil, nos estados do Acre, Amazonas, Rondônia, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e no Rio Grande do Sul (Lima *et al.*, Carvalho *et al.*, 1998 e Spatz *et al.*, 1999). Essa espécie também foi registrada no Paraguai, além dos estados argentinos do Chaco e Corrientes, aumentando ainda mais os limites geográficos desta espécie. Esses moluscos possuem concha com 6,5 a 7 giros, diâmetro de até 21 mm e até 8 mm de largura. O último giro apresenta uma carena, mais acentuada no lado esquerdo. Lado direito e esquerdo côncavos. A superfície ventral do tubo renal também é lisa. Espermateca ovóide ou claviforme. Bainha do pênis menor e mais delgada que o prepúcio (Paraense, 1981). A concha é indistinguível de *B. tenagophila* e de *B. t. guaibensis* (Paraense & Deslandes, 1955a, Paraense, 1984), assim como a maioria dos órgãos do sistema genital. *Biomphalaria occidentalis* não possui bolsa na parede ventral da vagina, que é característica marcante em *B. tenagophila* e na sua subespécie *B. t. guaibensis*. *Biomphalaria occidentalis* e *B. tenagophila* são biologicamente separadas por absoluto isolamento reprodutivo (Paraense, 1981). *Biomphalaria occidentalis* e *B. t. guaibensis* distinguem-se, ainda, por diferenças significativas nas razões entre o complexo peniano e o complexo uterino.

Paraense (1984), quando descreveu a subespécie *B. t. guaibensis*, fez alusão à futura publicação com cruzamentos, entre *B. t. guaibensis* e *B. tenagophila* e entre *B. t. guaibensis* e *B. occidentalis*, que trariam apoio adicional a classificação de subespécie. Entretanto, estes dados nunca foram publicados.

A distribuição geográfica no Brasil dessas três espécies está mostrada na figura 1, bem como o mapa de prevalência da esquistossomose.

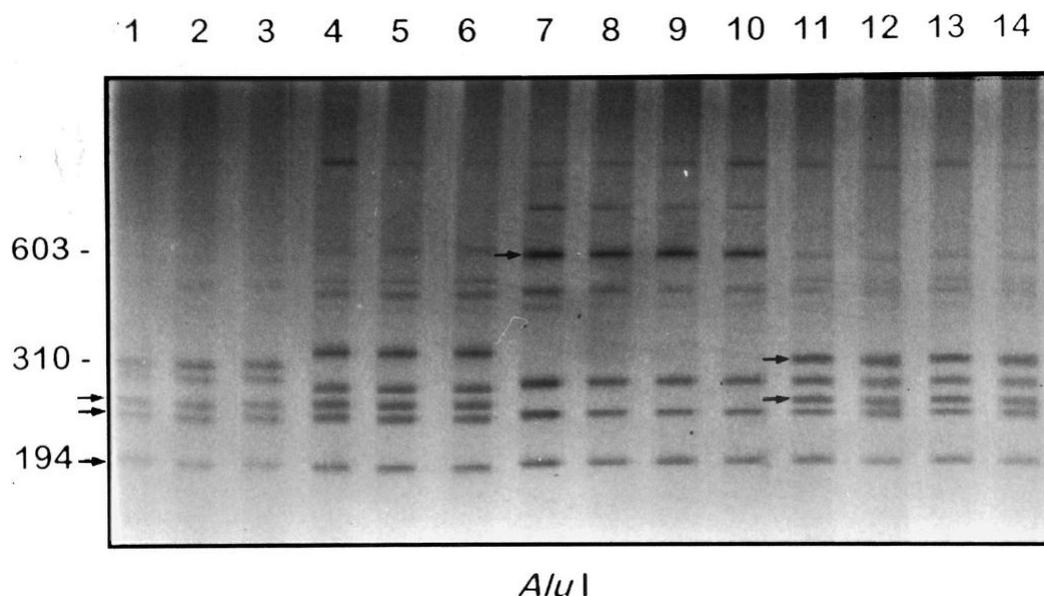


**Figura 1:** Distribuição geográfica de *Biomphalaria tenagophila* (Bt), *B. tenagophila guaibensis* (Btg) e *Biomphalaria occidentalis* (Boc) no Brasil e a distribuição da prevalência da esquistossomose (Fonte: Gerência do Programa Nacional de Controle da Esquistossomose/ Secretaria de Vigilância em Saúde/MS. 2008 - modificado)

### 1.3.2 Identificação molecular de *B. t. guaibensis*

A técnica de reação em cadeia da polimerase associada ao polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (PCR-RFLP), direcionada para a região do ITS do rDNA e clivada com a enzima de restrição *Ddel*, usada comumente para distinção da maioria das espécies brasileiras de *Biomphalaria* (Vidigal *et al.*, 2000), não diferencia os perfis *B. occidentalis* e *B. t. guaibensis* (Spatz *et al.*, 1999). Assim,

Spatz *et al* (1999), utilizando essa mesma técnica, mas com a enzima de restrição *AluI*, distinguiu os perfis de *B. tenagophila*, *B. t. guaibensis* e *B. occidentalis*.



**Figura 2:** Gel de poliacrilamida 6% com os perfis da PCR-RFLP, mostrando a digestão do rDNA ITS com a endonuclease *AluI*. Os perfis dos moluscos são: canaletas 1 a 6: *B. tenagophila*, canaletas 7 a 10: *B. t. occidentalis* e canaletas 11 a 14: *B. t. guaibensis*. Os marcadores moleculares estão mostrados do lado esquerdo da figura. As setas indicam os fragmentos espécie-específicos (Spatz *et al.*, 1999)

A análise de reconstrução filogenética, baseada na sequência nucleotídica do ITS2 do gene rDNA de *B. tenagophila*, *B. occidentalis* e *B. t. guaibensis*, sugere estreita relação entre essas espécies (Vidigal *et al.*, 2004), confirmando o agrupamento das mesmas em um complexo (Spatz *et al.*, 1999). Foi demonstrado, ainda, que *B. t. guaibensis* possui mais afinidade com *B. occidentalis* do que com *B. tenagophila*, embora estes autores tenham sugerido a necessidade de comprovação do isolamento reprodutivo entre as mesmas.

#### 1.4 Isolamento reprodutivo e cruzamentos

Embora a observação da evolução através do isolamento reprodutivo tenha sido foco de grande interesse desde a publicação da “Síntese Moderna”, sua quantificação muitas vezes não é um exercício trivial (Dillon *et al.*, 2011). Talvez por isso, apesar desse instrumento ser muito valioso, ele tem sido pouco utilizado para esclarecer o limite entre as espécies e detectar áreas de hibridação.

Entre os taxa de animais, os esforços para detectar isolamentos reprodutivos tem se concentrado em *Drosophila* (Coyne, 1989 e 1997), pássaros (Price & Bouvier, 2002; Lijtmaer *et al.*, 2003), anfíbios (Tilley *et al.*, 1990; Sasa *et al.*, 1998) e peixes (Russell, 2003 e Mendelson, 2003).

A importância do isolamento reprodutivo, em termos práticos, se dá na descrição de espécies válidas, uma vez que o conceito mais difundido para espécies na atualidade é baseado nesse princípio, e não apenas no fenótipo (Mayr, 1942 Apud Wilson & Brown-JR, 1953). Assim, essa metodologia foi utilizada para separação da recém descrita espécie, *B. occidentalis* de *B. tenagophila*, que apresentaram absoluto isolamento reprodutivo (Paraense, 1981).

Essa observação do isolamento reprodutivo através de pareamentos, apesar de laboriosa, é relativamente simples de ser interpretada em espécies de animais com fertilização interna e cópula, especialmente em gastrópodes pulmonados de água doce (Jarne & Auld, 2006). O fato de moluscos *Biomphalaria* se autofecundarem é um aspecto a ser considerado, uma vez que, se ocorrer redução da fecundação cruzada, eles podem utilizar-se da autofecundação (Paraense, 1959). Neste caso, marcadores moleculares ou morfológicos são úteis para confirmar o estado das progênes (Jarne *et al.*, 1993). Nos casos de fecundação cruzada entre espécies, a hibridação pode ocorrer em uma direção, enquanto a autofecundação ocorre quando se tenta realizar o cruzamento recíproco, determinando um isolamento reprodutivo unilateral. Além disso, muitas espécies praticam regularmente a autofecundação, mesmo na presença dos companheiros de sua própria espécie. Neste caso, o cruzamento é difícil de ser avaliado porque afeta uma fração pequena dos ovos produzidos (Paraense, 1959).

A utilização de moluscos albinos, como marcador biológico, em pareamentos, é de grande importância e vem ocorrendo há décadas, por vários autores, em: *Lymnaea peregra* (Boycott *et al.*, 1930); *Bulinus truncatus* (Larambergue, 1939); *Lymnaea stagnalis* (Cain, 1956); *B. glabrata* e *B. tenagophila* (Paraense & Deslandes 1955 a), *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea* (Mello-Silva *et al.*, 1998); *B. tenagophila* suscetíveis e resistentes (Rosa *et al.*, 2006); *B. amazonica* e *B. cousini* (Teodoro *et al.*, 2011). A produção de moluscos pigmentados pelo par albino, no pareamento entre albino versus pigmentado, indica ocorrência de cruzamento (Paraense, 1956), embora métodos mais modernos, como a biologia molecular, também possam ser usados.

### **1.5 Suscetibilidade dos moluscos do gênero *Biomphalaria* a *S. mansoni***

O parasitismo de moluscos pelo *S. mansoni*, mesmo sem infecção humana, é a razão pela qual essa interação deve ser um alvo relevante para a pesquisa (Bayne, 2009).

Os moluscos do gênero *Biomphalaria* têm enorme capacidade de protegerem-se de agentes estranhos devido à eficácia de seu sistema interno de defesa (Bayne, 2009). O nível de suscetibilidade de *Biomphalaria* à infecção por *S. mansoni* pode ser determinado por características genéticas do molusco, bem como do parasito. Além disso, a compatibilidade entre *S. mansoni* e seus hospedeiros intermediários é influenciada por fatores comportamentais e fisiológicos do molusco (Basch, 1976). Embora a transmissão potencial seja modulada pela genética de ambos, parasito-hospedeiro, o genótipo do hospedeiro tem grande efeito na produção de cercárias (Jones-Nelson *et al.*, 2011).

Newton (1952) foi o primeiro a defender que a suscetibilidade de *B. glabrata* a *S. mansoni* tem caráter hereditário. Mais tarde ficou provado, por meio de cruzamentos entre caramujos resistentes e suscetíveis, que o caráter resistência do molusco à infecção, adquirido na maturidade, segue uma segregação mendeliana de caráter dominante (Richards, 1970). Assim, partindo de pressuposto que *B. tenagophila* da linhagem Taim apresenta resistência a todas as cepas de *S. mansoni* testadas em todas as fases do desenvolvimento do caramujo (Santos *et al.*, 1979; Martins-Souza *et al.*, 2003; Coelho *et al.*, 2004), cruzamentos foram realizados entre estes e *B. tenagophila* Joinville (linhagem susceptível à infecção). Os resultados demonstraram que o caráter de resistência à infecção por *S. mansoni* nestes moluscos também é dominante (Rosa *et al.*, 2005).

Os tradicionais métodos parasitológicos de detecção de *S. mansoni* em moluscos do gênero *Biomphalaria*, exposição a estímulo luminoso e esmagamento entre duas placas de vidro, não são eficientes para detecção do parasito em períodos pré-patentes ou para exame de moluscos mortos. Assim, tem sido utilizada a técnica molecular LS-PCR (Low Stringency Polymerase Chain Reaction), que detecta o DNA de *S. mansoni* (Jannotti-Passos *et al.*, 1997). Esta técnica molecular baseia-se na utilização de uma baixa estringência de anelamento, permitindo que os primers (ER e EF) se liguem inespecificamente amplificando uma região “tandem” repetitiva no DNA mitocondrial de *S. mansoni*. Por meio desta técnica, já foram detectados DNA de *S. mansoni* até oito semanas após morte de moluscos infectados, ampliando a possibilidade de estudos epidemiológicos eficazes.

Entre as espécies *B. tenagophila* e *B. occidentalis* e a subespécie *B. t. guaibensis*, apenas a primeira foi descrita como suscetível a *S. mansoni* (Paraense & Côrrea, 1978; Paraense, 1982; Souza & Jannotti-Passos 2001; Paraense & Côrrea 1987), *B. occidentalis* mostrou-se resistente a diferentes tentativas de exposição a *S.*

*mansoni* (Paraense, 1982; Souza & Jannotti-Passos, 2001), e *B. t. guaibensis* não se infectou quando exposta a cinco miracídios/molusco da cepa SJ de *S. mansoni* (Paraense & Côrrea, 1987).

## **2 JUSTIFICATIVA**

O registro da subespécie *B. t. guaibensis* no sul do Brasil foi feito por Paraense em 1984. Desde então, raros estudos foram realizados com esta subespécie. Diante do panorama nacional em que três espécies do gênero *Biomphalaria* (*B. glabrata*; *B. tenagophila*, *B. straminea*) são encontradas naturalmente infectadas pelo *S. mansoni* e três (*B. peregrina*, *B. amazonica* e *B. cousini*) são infectadas experimentalmente, faz-se necessário o estudo da suscetibilidade da subespécie *B. t. guaibensis* a *S. mansoni*, com o objetivo de avaliar sua importância epidemiológica na disseminação deste trematódeo. Outro importante aspecto é a avaliação do *status* de subespécie de *B. t. guaibensis*, que pode ser realizado por meio de pareamentos com *B. tenagophila* e com *B. occidentalis*, uma vez que essas três são morfológica e molecularmente semelhantes entre si e fazem parte do complexo *Biomphalaria tenagophila*.

## **3 OBJETIVOS**

### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar a suscetibilidade de *Biomphalaria tenagophila guaibensis* a diferentes cepas de *S. mansoni* e seu posicionamento como subespécie.

### 3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a suscetibilidade de *B. t. guaibensis*, através da exposição a 50 e 100 miracídeos das cepas LE, SJ e AL de *S. mansoni*;
- Validar o posicionamento de *B. t. guaibensis* como subespécie através do pareamento entre: *B. t. guaibensis* (pigmentado) x *B. occidentalis* (pigmentado) e *B. t. guaibensis* (pigmentado) x *B. tenagophila* (albino);
- Verificar a direção de transferência de espermatozóide nos casos de cruzamento comprovado;
- Avaliar a suscetibilidade dos moluscos das gerações F1 e F2, originárias dos cruzamentos, através da exposição dos moluscos a 100 miracídeos da cepa SJ de *S. mansoni*.

## **4 METODOLOGIA**

#### **4.1 Moluscos**

Foram utilizados exemplares de *B. t. guaibensis* (Guaíba-RS), de *B. occidentalis* (Várzea das Flores, Betim-MG) e de *B. tenagophila* (Joinville-SC). Como controle, foram utilizados exemplares de *B. glabrata* originários do Barreiro de Cima-MG. Os moluscos foram criados e mantidos em colônias no Moluscário “Lobato Paraense”, do Centro de Pesquisa René Rachou (CPqRR), FIOCRUZ, em Belo Horizonte/MG, segundo condições previamente estabelecidas por Jannotti-Passos *et al* (2008).

#### **4.2 *Schistosoma mansoni***

Foram utilizadas as cepas LE, SJ e AL de *S. mansoni*, mantidas no Moluscário “Lobato Paraense” do CPqRR. A cepa LE de *S. mansoni* foi isolada de paciente em Belo Horizonte/MG em 1968. A cepa SJ foi isolada de moluscos *B. tenagophila* naturalmente infectados da região de São José dos Campos/SP, na década de 1960. A cepa AL foi isolada, em 1980, a partir de cercárias liberadas de *B. glabrata* procedentes do estado de Alagoas. A manutenção dos ciclos das diversas cepas de *S. mansoni* são realizadas através de sucessivas passagens por hamsters (*Mesocricetus auratus*) e *B. glabrata*, de acordo com a técnica descrita por Pellegrino & Katz (1968) e modificado por Jannotti-Passos *et al* (2008).

#### **4.3 Exposição de moluscos às diversas cepas de *Schistosoma mansoni***

A exposição individual dos moluscos foi realizada segundo Jannotti-Passos *et al* (2008). O número de moluscos, miracídios e cepas de *S. mansoni* utilizados no experimento estão mostradas na tabela 1. Como controle de infecção, foram utilizados exemplares de *B. glabrata* expostos a 10 miracídios/molusco. Como controle de mortalidade foram utilizados 10 moluscos de cada espécie das mesmas localidades e mesmos diâmetros, não infectados.

**Tabela 1:** Molusco, quantidade, diâmetro e número de miracídios/molusco utilizados no experimento de exposição individual de *Biomphalaria* a *S. mansoni* (cepas LE, SJ e AL)

<b>Molusco</b>	<b>Número de moluscos</b>	<b>Diâmetro (mm)</b>	<b>Número de miracídios/molusco das cepas LE/SJ/AL</b>
<i>Biomphalaria tenagophila guaibensis</i>	50	4-6	50/100
<i>B. t. guaibensis</i> (controle de mortalidade)	10	4-6	-
<i>Biomphalaria glabrata</i> (controle de infecção)	50	6-8	10
<i>B. glabrata</i> (controle de mortalidade)	10	6-8	-

#### 4.3.1 Exame dos moluscos

O primeiro exame, por estímulo luminoso (Jannotti-Passos *et al.*, 2008), foi realizado 30 dias após exposição aos miracídios. Os moluscos foram examinados semanalmente até completarem 80 dias da exposição. Ao final deste período, os moluscos negativos foram esmagados entre duas placas de vidro para verificação da presença de cercárias e/ou esporocisto. Os moluscos *B. t. guaibensis* e *B. glabrata* (controle) expostos ao *S. mansoni*, que morreram durante o experimento foram criopreservados e posteriormente submetidos a exame molecular pela técnica de reação em cadeia da polimerase em baixa estringência de anelamento (LS-PCR) (Jannotti-Passos *et al.*, 1997), como descrito no item 4.3.3, para possível detecção do DNA do parasito.

#### 4.3.2 Cálculo da taxa de infecção e de mortalidade

O cálculo da taxa de infecção foi realizado utilizando a seguinte expressão:

$$\text{Taxa de Infecção} = \frac{\text{Número de moluscos positivos} \times 100}{\text{Número total de moluscos examinados}}$$

O cálculo da taxa de mortalidade foi realizado, utilizando a seguinte expressão:

$$\text{Taxa de mortalidade} = \frac{\text{Número de moluscos vivos ao final do experimento} \times 100}{\text{Número de moluscos no início dos experimentos}}$$

### 4.3.3 LS-PCR

A LS-PCR é uma variação da PCR que utiliza um par de iniciadores específicos em baixa temperatura de anelamento para amplificação do DNA mitocondrial de *S. mansoni*. Os iniciadores utilizados são ER (5' - ACCTACCGTACTATGACG) e EF (5' - GGTTTCTTAGTGTTATAGCC). As condições gerais da reação, como reagentes e suas concentrações, foram as mesmas utilizadas por Jannotti-Passos *et al.* (1997). O volume final da reação foi de 10 µL, com 1ng de DNA alvo, 5pmol de cada um dos iniciadores, 200 µM de cada deoxinucleotídeo trifosfato (dNTP – PROMEGA), 0,8 unidades de *Taq* DNA polimerase em um tampão de 10mM Tris – HCl, pH 8,5, 50mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>. Após o preparo, cada reação foi coberta com aproximadamente 20 µL de óleo mineral para evitar a evaporação durante os ciclos de temperatura da PCR. Adotou-se um programa de 35 ciclos. O primeiro ciclo, de desnaturação, foi realizado a 95°C por 3min, o anelamento a 40°C por 1min e a extensão a 72°C por 1 min, seguido por 34 ciclos com desnaturação a 95°C por 45s, anelamento por 1min a 40°C e extensão a 72°C por 1min, sendo que no último ciclo o tempo de extensão foi alterado para 5min.

### 4.4 Experimentos de cruzamento

A técnica de pareamentos utilizada foi baseada na metodologia descrita nas Diretrizes Técnicas: Vigilância e Controle de Moluscos de Importância Epidemiológica (Brasil, 2008). Os pareamentos realizados foram: 1) *B. t. guaibensis* (pigmentado) x *B. occidentalis* (pigmentado) e 2) *B. t. guaibensis* (pigmentado) x *B. tenagophila* (albino).

Para formação de novas colônias, nestes experimentos, alguns exemplares (das colônias mantidas no Moluscário Lobato Paraense) foram submetidos à confirmação do perfil espécie específico através da PCR-RFLP. Este estudo foi baseado no fato de que cada espécie e subespécie possui seu próprio perfil molecular pelo PCR-RFLP (ver figura 1). Esses moluscos foram mantidos em recipientes individuais devidamente identificados. Uma vez confirmados o perfil desses moluscos iniciou-se as novas colônias e esses eram as matrizes. Os descendentes, exemplares de *B. t. guaibensis* e *B. occidentalis*, ambos de linhagem pigmentada (uma vez que ainda não foram encontrados moluscos albinos nem da subespécie e nem de *B. occidentalis*) e com 5-6 mm diâmetro, foram isolados individualmente em recipientes plásticos com 200 mL de água desclorada, até que

ocorresse a deposição das primeiras desovas em virtude de autofecundação. Essa foi à comprovação que os moluscos eram férteis e sexualmente maduros. Em recipientes plásticos, com 200 mL de água desclorada, foram introduzidos: um exemplar de *B. t. guaibensis* (pigmentado) e um exemplar de *B. occidentalis* (pigmentado). Foram realizados cinco pareamentos. Ao final de 10 dias, os progenitores foram separados para desovarem individualmente (Paraense, 1981). Dez moluscos descendentes de cada progenitor, e os próprios, totalizando 110 moluscos, foram analisados molecularmente para verificação dos perfis moleculares, uma vez que como não havia marcador biológico, o marcador utilizado seria o molecular. Estes exemplares foram anestesiados com solução de pentobarbital sódico por 6 horas. Em seguida, um dos tentáculos de cada filhote foi retirado com auxílio de tesoura e submetido à extração de DNA, seguida da PCR-RFLP, para obtenção do perfil molecular. Com este procedimento, os moluscos eram preservados e devolvidos para os recipientes de origem.

#### **4.4.1 Comprovação do cruzamento**

No pareamento entre *B. t. guaibensis* (pigmentado) x *B. tenagophila* (albino) foi utilizado o albinismo associado a PCR-RFLP. Foram realizados 10 pareamentos. A metodologia utilizada foi a mesma descrita anteriormente, porém apenas 10 moluscos F1 pigmentados descendentes de cada *B. tenagophila* (albino) foram analisados molecularmente, ou seja, foram analisados o perfil apenas dos F1 dos cruzamentos comprovados pelo marcador biológico.

#### **4.4.2 Avaliação da direção da transferência dos espermatozoides**

Cinco pareamentos, utilizando o mesmo protocolo do pareamento *B. t. guaibensis* (pigmentado) x *B. occidentalis* (pigmentado), foram realizados e analisou-se molecularmente o perfil de dez moluscos descendentes de cada progenitor e dos progenitores.

### **4.5 Extração de DNA**

O DNA foi extraído a partir dos tentáculos dos moluscos, utilizando o “Kit Wizard” (Promega). Inicialmente, foram adicionados 200µL de solução de lise nuclear com 1µL de proteinase K (20µg/mL) ao fragmento de tecido, e incubado a 37°C por 16 horas. Posteriormente, foram adicionados 80µL de solução de precipitação proteica®. A suspensão foi agitada vigorosamente com auxílio do vórtex

por 20 segundos e, em seguida, centrifugada a 13.000 RPM por 3 minutos. O sobrenadante foi transferido para um tubo contendo 200µL de isopropanol, homogeneizado por inversão durante 20 minutos e centrifugado a 13.000 RPM por 6 minutos. O sobrenadante foi descartado, e o *pellet* foi ressuspensão com 500µL de etanol absoluto juntamente com 10µL de acetato de sódio 3M pH 5.2 por 2 horas a -70 °C. Após este período o DNA foi lavado com 500µL de etanol 70% e centrifugado a 13.000 RPM por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi reidratado por 30 minutos, a 37°C, com 10µL de solução de re-hidratação®, e armazenado a -20°C.

#### **4.6 PCR específico direcionado para a região ITS- rDNA**

A amplificação da região espaçadora transcrita interna do DNA ribossomal (ITS-rDNA) foi realizada utilizando os iniciadores ETTS1 (5'-TGCTTAAGTTCAGCGGGT-3') e ETTS2 (5'-TAACAAGGTTTCCGTAGGTGAA-3') (Kane & Rollinson, 1994), homólogos às extremidades conservadas das subunidades 28S e 18S do gene do rRNA.

A PCR, com um volume total de 10 µL, consistiu de 1-10 ng de DNA alvo, tampão (50 mM KCl, 10mM Tris-HCl, pH 8,5), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP, 0,5 U de Taq-DNA polimerase (DNA polimerase termoestável da bactéria (*Thermus aquaticus*) e 5,0 pmol de cada iniciador. A reação foi coberta com uma gota de óleo mineral para evitar a evaporação e submetida aos ciclos de amplificação onde a desnaturação inicial foi feita por 3 minutos a 95°C, seguida de 32 ciclos: anelamento a 54°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 2 min e desnaturação a 95°C por 45 segundos; e uma extensão final a 72°C por 5 minutos.

Todos os experimentos foram acrescidos de um controle negativo, sem adição de DNA. Três microlitros do produto de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 6% e corados pela prata para observação do perfil dos produtos de PCR.

#### **4.7 PCR RFLP**

Os produtos de PCR direcionados para a região ITS foram diluídos em água, divididos em alíquotas de 10µL e digeridos separadamente com a endonuclease *AluI* (Promega). A reação de digestão com volume total de 11,3µL consistiu de 0,3µL (10 a 12U) da enzima, 1µL do respectivo tampão da enzima e 10µL do produto amplificado diluído. A restrição foi realizada a 37°C por 3 horas e 30 minutos,

seguida de 80°C por 20 minutos para desnaturação da enzima. Os produtos da restrição foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 6% e corados pela prata para observação dos perfis.

#### **4.8 Exposição dos moluscos das gerações F1 e F2 a *Schistosoma mansoni***

Moluscos da geração F1 resultantes de cruzamentos, comprovados por marcadores moleculares e/ou biológicos, e moluscos da geração F2 foram expostos a 100 miracídios da cepa SJ de *S. mansoni*, de acordo com item 4.3 e examinados conforme o item 4.3.1.

## **5 RESULTADOS**

## **5.1 Exposição individual de moluscos a *S. mansoni***

### **5.1.1 Exposição de *B. t. guaibensis* a 50 miracídios/molusco da cepa LE**

A taxa de infecção de moluscos *B. t. guaibensis* expostos a miracídios da cepa LE foi 0%, quando analisada por métodos parasitológicos e moleculares. A taxa de mortalidade de *B. t. guaibensis* expostos a miracídios foi 16%. Por outro lado, o controle positivo: *B. glabrata*, exposto a 10 miracídios/molusco da mesma cepa LE, apresentou taxa de infecção de 100% na análise por métodos parasitológicos; taxa de infecção de 88,2% nos exames moleculares (realizado em moluscos mortos) e a taxa total de infecção foi 92%. A taxa de mortalidade de moluscos *B. glabrata* expostos a miracídios foi 68%. Esses dados são apresentados na tabela 2. As taxas de mortalidade dos controles negativos de *B. t. guaibensis* e de *B. glabrata* foram 20% e 50% respectivamente.

### **5.1.2 Exposição de *B. t. guaibensis* a 100 miracídios/molusco da cepa LE**

Moluscos *B. t. guaibensis*, expostos a miracídios da cepa LE, apresentaram taxa de infecção de 0%, tanto na análise por métodos parasitológicos, quanto na análise por métodos moleculares. A taxa de mortalidade de moluscos *B. t. guaibensis* expostos a miracídios foi 51,1%. A taxa de infecção do controle positivo, *B. glabrata*, exposto a 10 miracídios/molusco, foi 100% para ambos os exames parasitológicos e moleculares (realizados em moluscos mortos). A taxa de mortalidade de moluscos *B. glabrata* expostos a miracídios foi 28,3%. Todos os dados estão descritos na tabela 2. As taxas de mortalidade dos controles negativos, *B. t. guaibensis* e *B. glabrata*, foram 20% e 0%, respectivamente.

**Tabela 2:** Resultado da exposição de *B. t. guaibensis* a 50 e 100 miracídios/molusco à cepa LE de *S. mansoni*

Molusco	N° de moluscos examinados	N° de miracídios/molusco	Moluscos mortos (%)	Moluscos positivos		
				Exame parasitológico (%)	Exame molecular (%)	Total (%)
<i>B. glabrata</i> controle de infecção	50	10	34 (68)	16 (100)	30 (88,2)	46 (92,0)
<i>B. glabrata</i> controle de mortalidade	10	-	5 (50)	-	-	-
<i>B. t. guaibensis</i>	50	50	8 (16)	0	0	0
<i>B. t. guaibensis</i> controle de mortalidade	10	-	2 (20)	-	-	-
<i>B. glabrata</i> controle de infecção	46	10	13 (28,3)	33 (100)	13 (100)	46 (100)
<i>B. glabrata</i> controle de mortalidade	10	-	0 (0)	-	-	-
<i>B. t. guaibensis</i>	47	100	24 (51,1)	0	0	0
<i>B. t. guaibensis</i> controle de mortalidade	10	-	2 (20)	-	-	-

### 5.1.3 Exposição de *B. t. guaibensis* a 50 miracídios/molusco da cepa SJ

Moluscos *B. t. guaibensis* apresentaram taxa de infecção de 0%, quando expostos a miracídios da cepa SJ, na análise por métodos parasitológicos e moleculares. A taxa de mortalidade dos moluscos *B. t. guaibensis* expostos a miracídios foi 46,7%. No controle positivo, *B. glabrata*, expostos a 10 miracídios/molusco, as taxas de infecção foram de 100% nos exames parasitológicos e de 66,7% nos exames moleculares (realizados em moluscos mortos), totalizando 95,6% de positividade. A taxa de mortalidade de moluscos *B. glabrata* expostos a miracídios foi 13%. Os dados podem ser verificados na tabela 3. Neste experimento, os controles negativos de *B. t. guaibensis* e de *B. glabrata* apresentaram taxas de mortalidade de 30% e de 20%, respectivamente.

### 5.1.4 Exposição de *B. t. guaibensis* a 100 miracídios/molusco da cepa SJ

As taxas de infecção de *B. t. guaibensis* expostos a miracídios foram 0% quando examinados por métodos parasitológicos e moleculares. A taxa de mortalidade de moluscos *B. t. guaibensis* expostos a miracídios foi 73,9%. O controle positivo, moluscos *B. glabrata* expostos a miracídios apresentaram taxa de infecção de 100% nos exames parasitológicos, 66,7% no exame molecular (realizado em moluscos mortos) e no total apresentaram taxa de infecção de 95,7%.

A taxa de mortalidade de moluscos *B. glabrata* infectados foi 12,8%. Neste experimento, os controles negativos apresentaram taxas de mortalidade de 10%, tanto para *B. t. guaibensis*, quanto para *B. glabrata*. Os dados podem ser visualizados na tabela 3.

**Tabela 3:** Resultado da exposição de *B. t. guaibensis* a 50 e 100 miracídios/molusco da cepa SJ de *S. mansoni*

Molusco	N° de moluscos examinados	N° de miracídios/molusco	Moluscos mortos (%)	Moluscos positivos		
				Exame parasitológico (%)	Exame molecular (%)	Total (%)
<i>B. glabrata</i> controle de infecção	46	10	6 (13)	40 (100)	4 (66,7)	44 (95,6)
<i>B. glabrata</i> controle de mortalidade	10	-	2 (20)	-	-	-
<i>B. t. guaibensis</i>	45	50	21 (46,7)	0	0	0
<i>B. t. guaibensis</i> controle de mortalidade	10	-	3 (30)	-	-	-
<i>B. glabrata</i> controle de infecção	47	10	6 (12,8)	41 (100)	4 (66,7)	45 (95,7)
<i>B. glabrata</i> controle de mortalidade	10	-	1 (10)	-	-	-
<i>B. t. guaibensis</i>	46	100	34 (73,9)	0	0	0
<i>B. t. guaibensis</i> controle de mortalidade	10	-	1 (10)	-	-	-

### 5.1.5 Exposição de *B. t. guaibensis* a 50 miracídios da cepa AL

Os moluscos *B. t. guaibensis* expostos a miracídios, mais uma vez, confirmaram a taxa de 0% de infecção em exames parasitológicos e moleculares. A taxa de mortalidade de *B. t. guaibensis* expostos a miracídios foi 70%. *Biomphalaria glabrata* (expostos a miracídios), apresentaram taxa de infecção de 95,6% nos exames parasitológicos, 85% no exame molecular (realizados em moluscos mortos) e, no total, a taxa de infecção foi 92,8%. A taxa de mortalidade de *B. glabrata* expostos a miracídios foi 47,6%. Todos os dados podem ser visualizados na tabela 4. Neste experimento, observamos que as taxas de mortalidade para os controles negativos de *B. t. guaibensis* e *B. glabrata* foram 60% e 0%, respectivamente.

### 5.1.6 Exposição de *B. t. guaibensis* a 100 miracídeos/molusco da cepa AL

Os moluscos *B. t. guaibensis*, mais uma vez, confirmaram as taxas 0% de infecção nos exames parasitológicos e moleculares. A taxa de mortalidade de *B. t. guaibensis* expostos a miracídeos foi 57,4%. Por outro lado, as taxas de infecção de *B. glabrata* expostos a miracídeos foram 100% quando analisados por métodos parasitológicos, 50% na análise por métodos moleculares (realizados em moluscos mortos) e a taxa total de infecção foi 93,7%. A taxa de mortalidade de *B. glabrata* expostos a miracídeos foi 12,5%. A tabela 4 demonstra todos os dados descritos. Neste experimento os controles negativos de *B. t. guaibensis* e *B. glabrata* apresentaram, ambos, taxas de mortalidade de 10%.

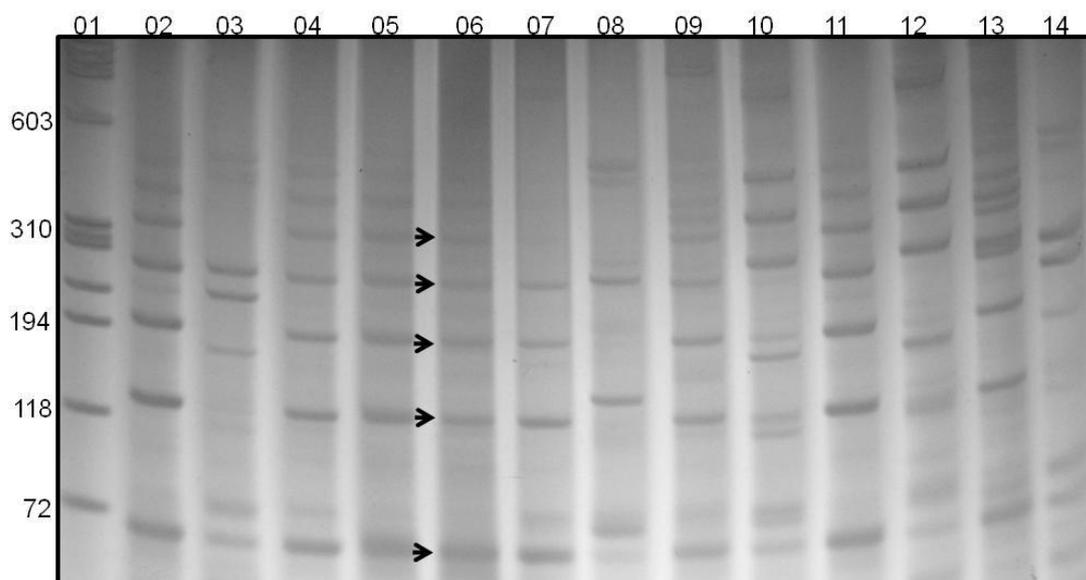
**Tabela 4:** Resultado da exposição de *B. t. guaibensis* a 50 e 100 miracídeos/molusco da cepa AL de *S. mansoni*

Molusco	N° de moluscos examinados	N° de miracídeos/molusco	Moluscos mortos (%)	Moluscos positivos		
				Exame parasitológico (%)	Exame molecular (%)	Total (%)
<i>B. glabrata</i> controle de infecção	42	10	20 (47,6)	22 (95,6)	17 (85)	39 (92,8)
<i>B. glabrata</i> controle de mortalidade	10	-	0	-	-	-
<i>B. t. guaibensis</i>	50	50	35 (70)	0	0	0
<i>B. t. guaibensis</i> controle de mortalidade	10	-	6 (60)	-	-	-
<i>B. glabrata</i> controle de infecção	48	10	6 (12,5)	42 (100)	3(50)	45 (93,7)
<i>B. glabrata</i> controle de mortalidade	10	-	1 (10)	-	-	-
<i>B. t. guaibensis</i>	47	100	27 (57,4)	0	0	0
<i>B. t. guaibensis</i> controle de mortalidade	10	-	1 (10)	-	-	-

### 5.1.7 LS-PCR

Foram realizados somente LS-PCR dos moluscos que morreram ao longo dos 80 dias de exposição. A figura 3 mostra um gel de poliacrilamida 6% com perfis de *B. glabrata* (controle de infecção), expostos a 10 miracídeos das cepas LE, SJ e AL de *S. mansoni*, que morreram ao longo do experimento. Na canaleta 6, é mostrado o perfil específico de *S. mansoni*, em forma de escada. Este perfil, em forma de escada, corresponde à amplificação da região repetitiva do fragmento de 62pb, disposto em “tandem” do mtDNA de *S. mansoni*. O perfil em forma de escada de *S.*

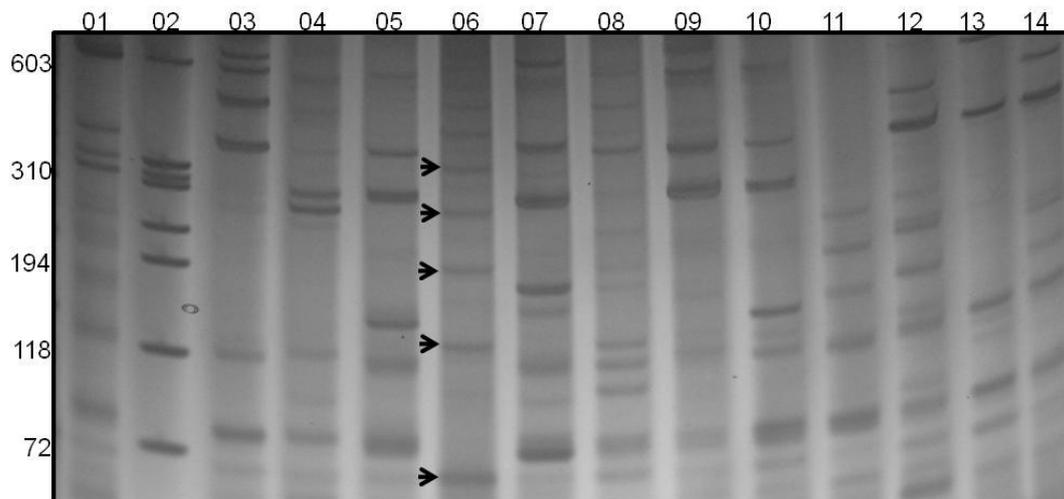
*mansoni* foi observado em todos os moluscos positivos: canaletas 2, 4, 5, 7, 9, 11 e 13. Em *B. glabrata* negativos, observa-se apenas um complexo de bandas, correspondente aos anelamentos aleatórios resultantes das condições de baixa estringência das reações, nas canaletas 3, 8, 10, 12 e 14.



**Figura 3:** Gel de poliácridamida 6% corado pela prata do DNA amplificado pela LS-PCR de exemplares de *Biomphalaria glabrata*, controles dos experimentos de *B. t. guaibensis*. Canaleta 1: padrão de peso molecular  $\times$  174. Canaleta 2: *B. glabrata* positivo do experimento com *B. t. guaibensis* cepa LE 50 miracídios/molusco. Canaleta 3: *B. glabrata* negativo do experimento *B. t. guaibensis* com cepa LE 50 miracídios/molusco. Canaletas 4 e 5: *B. glabrata* positivo do experimento com *B. t. guaibensis* cepa LE 100 miracídios/molusco. Canaleta 6: perfil de *S. mansoni*. Canaleta 7: *B. glabrata* positivo do experimento *B. t. guaibensis* com cepa SJ 50 miracídios/molusco. Canaleta 8: *B. glabrata* negativo do experimento *B. t. guaibensis* com cepa SJ 50 miracídios/molusco. Canaleta 9: *B. glabrata* positivo do experimento *B. t. guaibensis* com cepa SJ 100 miracídios/molusco. Canaleta 10: *B. glabrata* negativo do experimento *B. t. guaibensis* com cepa SJ 100 miracídios/molusco. Canaleta 11: *B. glabrata* positivo do experimento *B. t. guaibensis* com cepa AL 50 miracídios/molusco. Canaleta 12: *B. glabrata* negativo do experimento *B. t. guaibensis* cepa AL 50 miracídios/molusco. Canaleta 13: perfil de *B. glabrata* positivo do experimento *B. t. guaibensis* cepa AL 100 miracídios/molusco. Canaleta 14: *B. glabrata* negativo do experimento *B. t. guaibensis* com cepa AL 100 miracídios/molusco. As setas indicam as bandas características do perfil em forma de escada do mtDNA de *S. mansoni*.

A figura 4 mostra os perfis, gerados pela LS-PCR do DNA, de exemplares de *B. t. guaibensis*, expostos a 50 e a 100 miracídios das cepas LE, SJ e AL de *S. mansoni*, que morreram ao longo do experimento. Não houve a presença do perfil em forma de escada de *S. mansoni*, confirmando que não houve infecção desses moluscos. Canaletas 1 e 3: perfis de dois *B. t. guaibensis* negativos expostos a 50 miracídios da cepa LE. Canaletas 4 e 5: perfis de dois *B. t. guaibensis* negativos expostos a 100 miracídios da cepa LE. Canaletas 6 e 8 perfis de dois *B. t. guaibensis* negativos expostos a 50 miracídios da cepa SJ. Canaleta 7: *S. mansoni*. Canaletas 9 e 10: perfis de dois *B. t. guaibensis* negativos expostos a 100 miracídios da cepa SJ. E canaletas 11 e 12, 13 e 14, perfis de *B. t. guaibensis* negativos,

expostos à cepa AL, usando 50 miracídios nos dois primeiros e 100 miracídios nos dois últimos perfis.

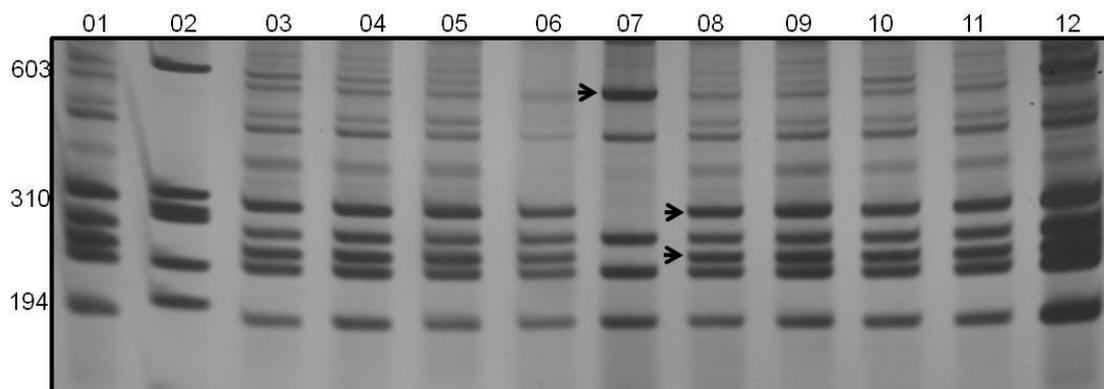


**Figura 4:** Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata do DNA amplificado pela LS-PCR de exemplares de *B. t. guaibensis* expostos a três cepas de *S. mansoni* com 50 e 100 miracídios/molusco. Canaletas 1 e 3: LE 50 miracídios/molusco. Canaleta 02: padrão de peso molecular  $\varnothing$  x 174. Canaletas 4 e 5: LE 100 miracídios/molusco. Canaleta 6: perfil de *S. mansoni*. Canaletas 7 e 8: SJ 50 miracídios/molusco. Canaletas 9 e 10: SJ 100 miracídios/molusco. Canaletas 11 e 12: AL 50 miracídios/molusco. Canaletas 13 e 14: AL 100 miracídios/molusco. As setas indicam as bandas características do perfil em forma de escada do mtDNA de *S. mansoni*.

## 5.2 Experimentos de cruzamento

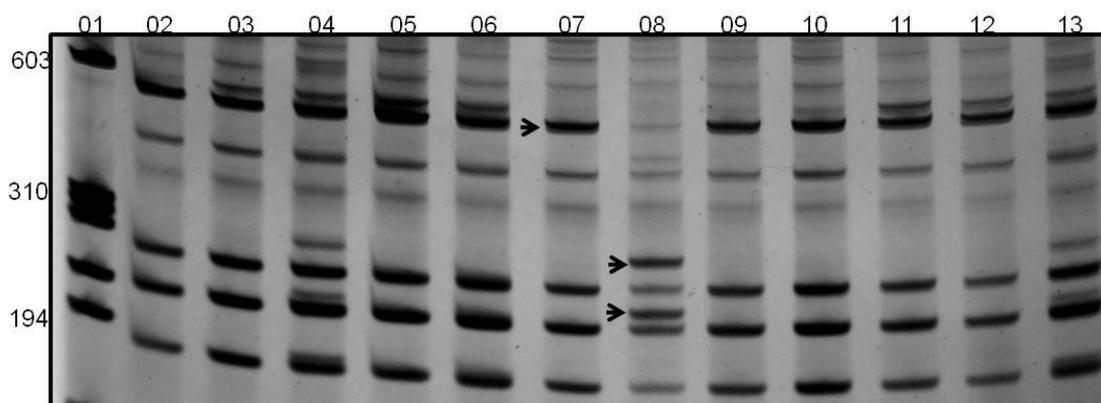
### 5.2.1 Pareamento *Biomphalaria tenagophila guaibensis* x *Biomphalaria occidentalis*

Nos cinco pareamentos realizados entre *B. t. guaibensis* pigmentado e *B. occidentalis* pigmentado, após a separação individual, dez moluscos da geração F1 de cada progenitor, e os próprios progenitores, totalizando 110 indivíduos, foram submetidos a PCR-RFLP para verificação do cruzamento pela análise dos perfis moleculares. A análise dos perfis demonstrou que a geração F1 apresentava os mesmos perfis dos progenitores, *B. t. guaibensis* e *B. occidentalis*, demonstrando que não houve cruzamento. A figura 5 mostra o perfil específico de nove indivíduos *B. t. guaibensis* da geração F1 do progenitor *B. t. guaibensis* (canaletas 1, 3 a 6 e 9 a 12), o perfil específico do par do pareamento *B. occidentalis* (canaleta 7) e o perfil específico do progenitor *B. t. guaibensis* (canaleta 8).



**Figura 5:** Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata com perfis da PCR-RFLP direcionada para a região ITS do rDNA. Canaletas: 1, 3-6 e 8-12: *B. t. guaibensis* – indivíduos da primeira geração oriundos do progenitor *B. t. guaibensis*. Canaleta 2: padrão de peso molecular  $\times 174$ ; canaleta 7: *Biomphalaria occidentalis* par do pareamento e canaleta 8: *Biomphalaria tenagophila guaibensis*, progenitor. Os valores dos marcadores moleculares são mostrados do lado esquerdo da figura. As setas indicam os fragmentos espécie-específicos.

A figura 6 mostra o perfil específico de dez indivíduos *B. occidentalis* da geração F1 do progenitor *B. occidentalis* (canaletas 2 a 6 e 9 a 13), o perfil específico do progenitor *occidentalis* (canaleta 7) e o perfil específico do par do pareamento *B. t. guaibensis* (canaleta 8).

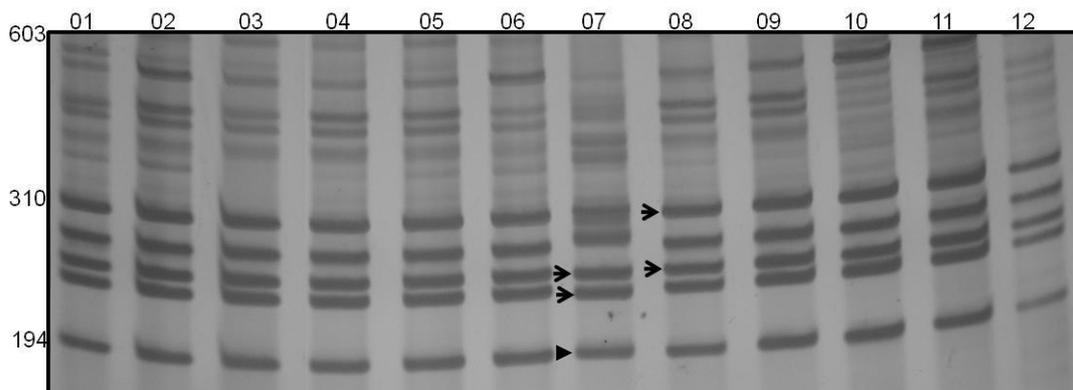


**Figura 6:** Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata com perfis da PCR-RFLP direcionada para a região ITS do rDNA. Canaleta 1: padrão de peso molecular  $\times 174$ ; canaletas: 2-6 e 9-13: *Biomphalaria occidentalis* – indivíduos da primeira geração oriundos do progenitor *Biomphalaria occidentalis*. Canaleta 7: *Biomphalaria occidentalis* progenitor e canaleta 8: *Biomphalaria tenagophila guaibensis*, par do pareamento. Os valores dos marcadores moleculares são mostrados do lado esquerdo da figura. As setas indicam os fragmentos espécie-específicos.

### 5.2.2 Pareamento *Biomphalaria tenagophila guaibensis* x *Biomphalaria tenagophila*

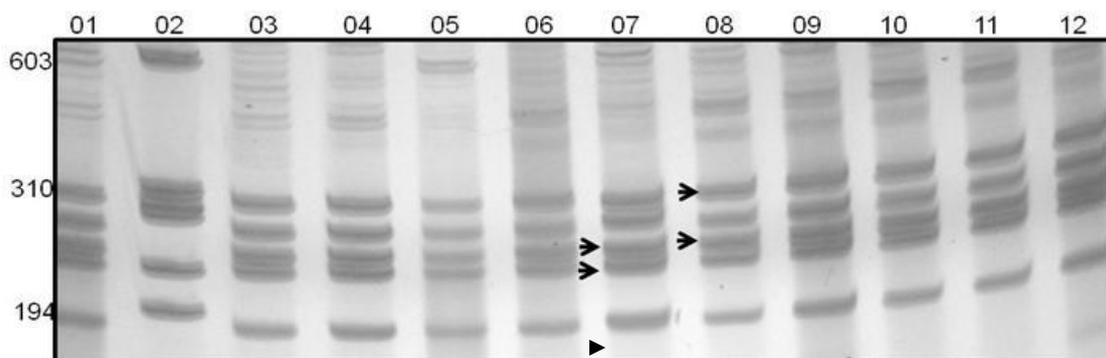
Para verificação dos cruzamentos foram realizados 10 pareamentos entre *B. t. guaibensis* pigmentado e *B. tenagophila* albino, apenas em três verificou-se cruzamento, pela presença de exemplares pigmentados (F1) oriundos de progenitor albino. De dois progenitores albinos, foram selecionados 20 moluscos (F1) pigmentados (dez de cada). Do terceiro progenitor albino, foram encontrados apenas

os dois moluscos F1 pigmentados gerados. O total de 22 indivíduos foi submetido a PCR-RFLP para verificação do cruzamento pela análise do perfil molecular. A análise dos perfis indica que a geração F1 pigmentada de *B. tenagophila* albino apresentava o perfil de *B. t. guaibensis*, demonstrando que ocorreram cruzamentos entre os três pares. A figura 7 mostra o perfil específico de dez indivíduos da geração F1 do progenitor *B. tenagophila* albino (canaletas 1 a 6 e 9 a 12), o perfil específico de *B. tenagophila* albino (canaleta 7) e o perfil específico do par do pareamento *B. t. guaibensis* (canaleta 8).



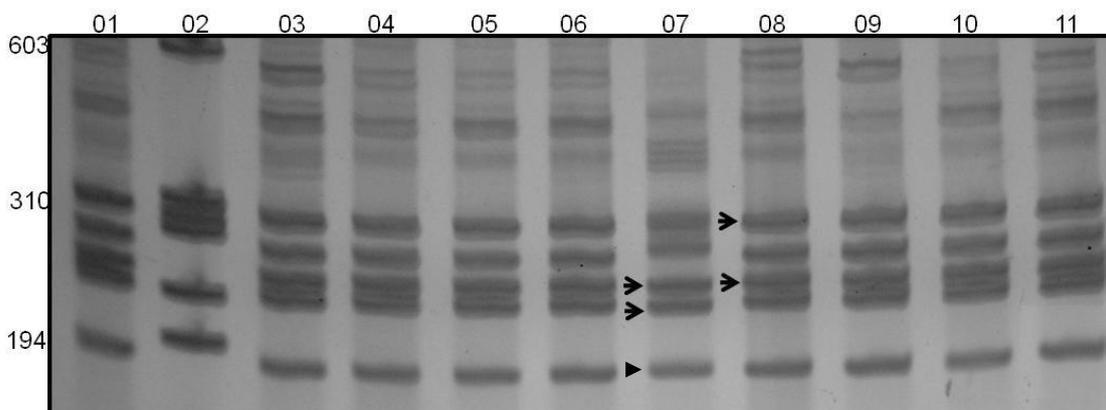
**Figura 7:** Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata com perfis da PCR-RFLP direcionada para a região ITS do rDNA. Canaletas: 01-06 e 09-12: *B. t. guaibensis* – indivíduos da primeira geração oriundos do progenitor *Biomphalaria tenagophila* (albino). Canaleta 07: *Biomphalaria tenagophila* (albino) progenitor e canaleta 08: *Biomphalaria tenagophila guaibensis*, par do cruzamento. Os valores dos marcadores moleculares são mostrados do lado esquerdo da figura. As setas indicam os fragmentos espécie-específicos.

Uma vez confirmado o cruzamento, foram realizados cinco pareamentos entre *B. t. guaibensis* pigmentado e *B. tenagophila* albino para verificação da direção da transferência dos espermatozóides. Após a separação individual, dez moluscos da geração F1 de cada progenitor e os respectivos progenitores, totalizando 110 indivíduos, foram submetidos a PCR-RFLP para verificação do cruzamento pela análise do perfil molecular. A análise dos perfis demonstrou que, em apenas um pareamento, a geração F1 pigmentada, de *B. tenagophila* albino, apresentou o perfil de *B. t. guaibensis*, indicando que ocorreu cruzamento. A figura 8 mostra o perfil específico de nove indivíduos *B. t. guaibensis* (geração F1) do progenitor *B. tenagophila* albino (canaletas 1, 3 a 6 e 9 a 12), o perfil específico de *B. tenagophila* albino (canaleta 7) e o perfil específico do par do cruzamento *B. t. guaibensis* (canaleta 8).



**Figura 8:** Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata com perfis da PCR-RFLP direcionada para a região ITS do rDNA. Canaletas: 1,3-6 e 9-12: *B. t. guaibensis* – indivíduos da primeira geração oriundos do progenitor *Biomphalaria tenagophila* (albino). Canaleta 2: padrão de peso molecular  $\varnothing$  x 174, canaleta 7: *Biomphalaria tenagophila* (albino) progenitor e canaleta 8: *Biomphalaria tenagophila guaibensis*, par do cruzamento. Os valores dos marcadores moleculares são mostrados do lado esquerdo da figura. As setas indicam os fragmentos espécie-específicos.

Os perfis da geração F1 de *B. t. guaibensis* pigmentado foram analisados molecularmente e mostraram-se semelhantes ao progenitor, indicando que o cruzamento foi unilateral e que *B. t. guaibensis* foi o doador do esperma. A figura 9 mostra os perfis específicos de oito indivíduos da geração F1 de *B. t. guaibensis* (canaletas 1, 3 a 6 e 9 a 11), o perfil específico do par do cruzamento *B. tenagophila* albino (canaleta 7) e o perfil específico do progenitor *B. t. guaibensis* (canaleta 8).



**Figura 9:** Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata com perfis da PCR-RFLP direcionada para a região ITS do rDNA. Canaletas: 01,03-06 e 09-11: *B. t. guaibensis* – indivíduos da primeira geração oriundos do progenitor *Biomphalaria tenagophila* (albino). Canaleta 02: padrão de peso molecular  $\varnothing$  x 174, canaleta 07: *Biomphalaria tenagophila* (albino) progenitor e canaleta 08: *Biomphalaria tenagophila guaibensis*, par do cruzamento. Os valores dos marcadores moleculares são mostrados do lado esquerdo da figura. As setas indicam os fragmentos espécie-específicos.

Nos quatro cruzamentos de *B. t. guaibensis* (pigmentado) com *B. tenagophila* (albino), dois produziram apenas *B. t. guaibensis* (pigmentados) nos 30 dias de isolamento do molusco pós-cruzamento e dois produziram moluscos pigmentados e albinos.

### 5.3 Exposição dos moluscos F1 e F2 pigmentados resultantes dos cruzamentos *B. t. guaibensis* x *B. tenagophila* (albino) à cepa SJ de *S. mansoni*

A taxa de infecção (exames parasitológico e molecular) dos 10 moluscos da geração F1 pigmentados obtidos de *B. tenagophila* albino expostos a 100 miracídeos foi 0% e a taxa de mortalidade foi 40%.

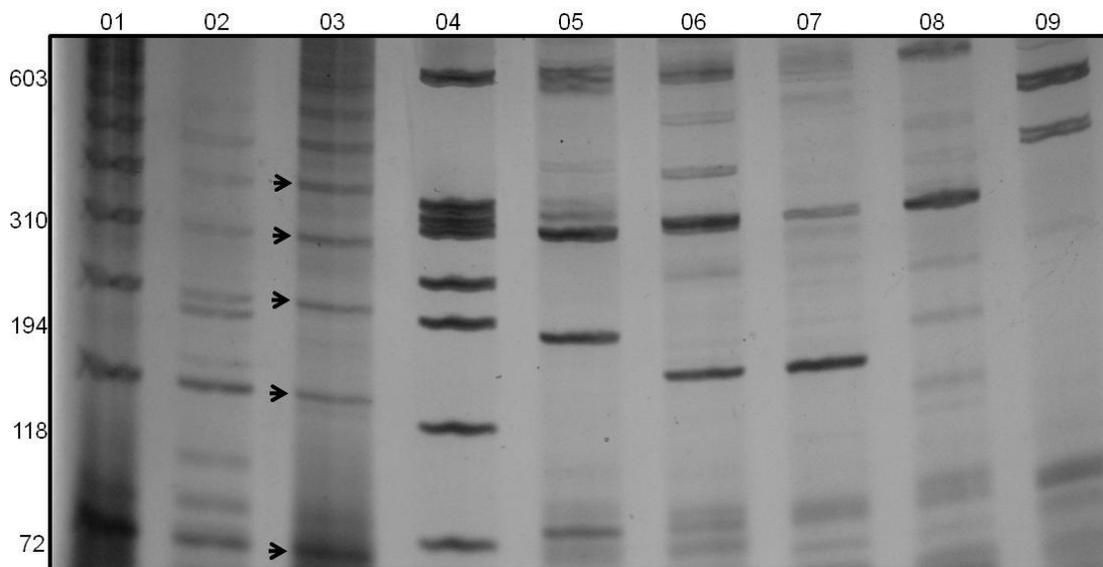
Moluscos F1 pigmentados obtidos de *B. tenagophila* (albino) geraram moluscos F2 por autofecundação. A taxa de infecção obtida nos exames parasitológicos e molecular de 15 exemplares da geração F2 expostos a 100 miracídeos foi 0% e a taxa de mortalidade foi 10%. Os controles positivos (*B. glabrata*) mostraram 100% de infecção nos exames parasitológico e molecular. Os controles negativos das gerações F1 e F2 e *B. glabrata* mostraram taxas de mortalidade de 10%, 0% e 20%, respectivamente (tabela 5).

**Tabela 5:** Exposição dos moluscos F1 e F2 pigmentados *B. t. guaibensis* de *B. tenagophila* albino a 100 miracídeos/molusco da cepa SJ de *S. mansoni*

Molusco	N° de moluscos examinados	N° de miracídeos/molusco	Moluscos mortos (%)	Moluscos positivos		
				Exame parasitológico (%)	Exame molecular (%)	Total (%)
<i>B. t. guaibensis</i> F1	10	100	04(40)	0	0	0
<i>B. t. guaibensis</i> controle negativo F1	05	-	1(10)	-	-	-
<i>B. glabrata</i> controle positivo	10	10	2(20)	8(100)	2(100)	10 (100)
<i>B. glabrata</i> controle negativo	05	-	0	-	-	-
<i>B. t. guaibensis</i> F2	15	100	1(10)	0	0	0
<i>B. t. guaibensis</i> controle negativo F2	05	-	-	-	-	-

A figura 10 mostra os perfis, gerados pelo LS-PCR do DNA, dos moluscos expostos à cepa SJ de *S. mansoni*: *B. glabrata* (10 miracídeos/molusco), gerações F1 e F2 de *B. t. guaibensis* (100 miracídeos/molusco), que morreram ao longo do experimento. Na canaleta 3, é mostrado o perfil específico de *S. mansoni*, em forma de escada. O perfil em forma de escada de *S. mansoni* foi observado nos moluscos *B. glabrata*, controles positivos: canaletas 1 e 2. Não houve a presença do perfil em forma de escada de *S. mansoni* nos moluscos das gerações F1 e F2, confirmando

que não houve infecção desses moluscos: canaletas 5 a 8 (perfil dos moluscos F1) canaleta 9 (perfil do moluscos F2).



**Figura 10:** Gel de poli-acrilamida 6% corado pela prata com perfis de *B. glabrata* controles positivos de F1 e F2 pigmentados de *B. tenagophila* albino, expostos a 100 miracídeos/moluscos da cepa SJ, submetidos a LS-PCR. Canaletas: 1 e 2 *B. glabrata* positivas, controle da infecção, infectadas com 10 miracídeos/molusco, 3 perfil de *S. mansoni*. Canaleta 4: padrão de peso molecular  $\times 174$ . Canaletas 5-8: F1 infectado com 100 miracídeos/molusco. Canaleta 9: F2 infectado com 100 miracídeos/molusco. As setas indicam as bandas características do perfil em forma de escada do mtDNA de *S. mansoni*.

## **6 DISCUSSÃO**

A subespécie *Biomphalaria tenagophila guaibensis*, foi descrita por Paraense (1984) e desde então, poucos estudos foram realizados a respeito desses moluscos. Distingue-se da espécie nominativa *B. tenagophila* por pequenas diferenças quantitativas no aspecto do complexo peniano: prepúcio e bainha do pênis mais longos e proporcionalmente mais delgados em *B. t. guaibensis* e mais curto e proporcionalmente mais grossos em *B. tenagophila*. A concha e os outros órgãos do sistema genital são semelhantes entre os dois moluscos. A categoria de subespécie foi definida por ter sua distribuição espacial limitada, satisfazendo a definição de subespécie como “um agregado da população local definido geograficamente, que difere-se taxonomicamente das outras subdivisões da espécie” (Mayr, Linsley & Usinger, 1953 Apud Paraense 1984). A subespécie, *B. t. guaibensis*, é semelhante morfológicamente de *B. occidentalis*, porém apresenta diferença qualitativa importante que é a ausência de bolsa na parede vaginal, presente em *B. t. guaibensis*.

Dentre *B. tenagophila*, *B. occidentalis* e *B. t. guaibensis* apenas a primeira é hospedeira intermediária de *S. mansoni*. Esta espécie é encontrada na natureza, desde Sudeste até o extremo Sul do país, com baixos índices de infecção. Porém, em estudos de infecção experimental apresentou índices de positividade que variam de 0 a 91,5% (Paraense & Corrêa, 1978; Paraense & Corrêa, 1987). Uma população desta espécie tem mostrado total resistência a *S. mansoni*. Trata-se de *B. tenagophila* isolada da Reserva Biológica do Taim no Rio Grande do Sul, Brasil; (Santos *et al.*, 1979; Martins-Souza *et al.*, 2003; Rosa *et al.*, 2006).

*Biomphalaria occidentalis* foi estudada quanto à suscetibilidade a *S. mansoni* por Paraense & Corrêa (1982) que realizaram exposição com cinco miracídios/molusco da cepa SJ e observaram que esses moluscos não se infectavam. A metodologia utilizada foi laboriosa, uma vez que eram realizados quatro exames diários, sendo imediatamente dissecados os moluscos que morriam. Posteriormente, Souza & Jannotti-Passos (2001) confirmaram essa resistência utilizando a técnica de LS-PCR para detectar a presença de DNA de *S. mansoni* em moluscos *B. occidentalis* após sete dias da exposição, período pré-patente.

Na única exposição de *B. t. guaibensis* a *S. mansoni* descrita (Paraense & Corrêa 1987), descendentes F1 (125 moluscos) da localidade tipo (Guaíba/RS) foram expostos a apenas cinco miracídios/molusco da cepa SJ, e examinados por estímulo luminoso. O exame de dissecação (depois de 70 dias após exposição)

confirmou que os moluscos estavam negativos para *S. mansoni*. Como ainda restavam dúvidas sobre a suscetibilidade de *B. t. guaibensis* a *S. mansoni*, o próprio autor (Paraense & Corrêa 1987) sugeriu que outros estudos fossem realizados.

Vinte e cinco anos se passaram, e nesta dissertação confirmamos que *B. t. guaibensis* não é suscetível às cepas LE, SJ e AL de *S. mansoni*, sendo aumentada à pressão de exposição (50 e 100 miracídios/molusco). Nossos resultados mostram que os exemplares de *B. t. guaibensis* foram negativos, tanto nos exames parasitológicos (estímulo luminoso e esmagamento) quanto molecular (LS-PCR), que não detectou DNA de *S. mansoni* em nenhum exemplar de *B. t. guaibensis* que morreu ao longo dos experimentos.

O estudo com as três cepas de *S. mansoni*, LE, SJ e AL, é particularmente importante, pois há variação na capacidade de diferentes cepas infectarem moluscos da mesma linhagem (Theron e Coustau 2005; Webster e Woolhouse 1998). Além disso, a viabilidade das três cepas foi confirmada pela infecção dos exemplares de *B. glabrata* utilizados como controles de infecção, expostos a 10 miracídios/molusco das mesmas cepas, que apresentaram taxas de infecção que variaram de 92 a 100%.

A exposição de *B. t. guaibensis* a cargas parasitárias mais elevadas (50 e 100 miracídios/molusco) foi necessária, uma vez que o único experimento de suscetibilidade realizado para a subespécie utilizou apenas cinco miracídios/molusco. Resultados que levaram o autor (Paraense & Corrêa 1987) a sugerir que outros experimentos fossem realizados. De fato, vários autores tem preferido usar menor número de miracídios (5, 10 ou 20) para as infecções experimentais (Paraense & Correa 1963, 1978, 1979), pois a alta pressão da infecção pode aumentar a mortalidade dos moluscos. Provavelmente, no processo de penetração do miracídio, existem receptores de membrana presentes no miracídios e seus correspondentes na superfície dos moluscos suscetíveis. Entretanto, essa característica pode ser individual, pois sabe-se que entre as espécies suscetíveis de *Biomphalaria* existem populações que se comportam como refratárias a infecção. Assim, ainda não se sabe, nestes casos, se o molusco é resistente (miracídios destruídos logo ao penetrar) ou refratário (não ocorre penetração) (Coelho *et al.*, 2008). Nos experimentos com *B. t. guaibensis*, não foi possível concluir se a subespécie é resistente ou refratária. Experimentos com cortes histológicos e/ou LS-PCR, em diversos intervalos de tempo, estão em andamento para tentar esclarecer este aspecto da biologia do molusco.

A alta mortalidade verificada em alguns experimentos com *B. glabrata* e *B. t. guaibensis*, expostas às três cepas do *S. mansoni*, talvez possa ser atribuída ao manuseio dos exemplares e pelo longo período do experimento, uma vez que eles foram estimulados a luz semanalmente até 80 dias após exposição. Moluscos *B. t. guaibensis* tem o agravante de estarem pouco adaptados às condições artificiais de laboratório, fato que faz com que as próprias formações de colônias sejam dificultadas. Nestes casos, a LS-PCR foi importante, pois comprovou a ausência de DNA do parasito nos moluscos que morreram ao longo dos experimentos. No experimento em que *B. t. guaibensis* foi exposto a 50 e 100 miracídios, o controle de mortalidade de *B. glabrata* apresentaram taxas de 50% e 0%, respectivamente. Essa diferença na porcentagem da mortalidade pode ter sido devido a manipulação incorreta dos moluscos. No entanto, o exame de todos os exemplares foi realizado, pois os moluscos que morreram ao longo dos experimentos foram examinados pela LS-PCR.

A confirmação da não suscetibilidade de *B. t. guaibensis* a *S. mansoni* contribui para ampliar o conhecimento dos moluscos inseridos no complexo *B. tenagophila* (*B. tenagophila*, *B. occidentalis* e *B. t. guaibensis*). Esse complexo foi proposto em virtude das semelhanças morfológicas e moleculares das duas espécies e da subespécie (Spatz *et al.*, 1999). Estudos moleculares realizados por Spatz *et al* (1999) e Vidigal *et al* (2004) sinalizaram a maior afinidade entre *B. t. guaibensis* e *B. occidentalis* do que com a sua espécie nominativa. Consequentemente, estudos sobre o cruzamento entre *B. tenagophila* x *B. t. guaibensis* e entre *B. t. guaibensis* x *B. occidentalis* mostravam-se relevantes para o entendimento das relações de afinidade entre essas espécies e subespécie de molusco.

O cruzamento entre algumas espécies tem gerado híbridos: *B. glabrata* e *B. alexandria* (Barbosa 1956; Barbosa *et al.*, 1958 a); *B. glabrata* e *B. tenagophila* (Mello-Silva, 1998) *B. cousini* e *B. amazonica* (Teodoro *et al.*, 2011) dentre outros. Teodoro *et al* (2011) demonstraram por meio de pareamento entre *B. amazonica* (albino) e *B. cousini* que o perfil molecular, obtido pela PCR-RFLP direcionada para a região ITS do rDNA e clivado com a endonuclease *Ddel*, do híbrido gerado é idêntico ao perfil de exemplares híbridos encontrados na natureza. Este perfil é constituído pelo conjunto dos perfis moleculares de *B. amazonica* e *B. cousini*. De fato, *B. amazonica* possui perfil com cinco fragmentos de aproximadamente 490, 320, 200, 120 e 110 pb e *B. cousini* três fragmentos de aproximadamente 490, 430 e

320 pb, enquanto o híbrido apresenta seis fragmentos de aproximadamente 490, 430, 320, 200, 120 e 110 pb. Partindo desse pressuposto e levando em consideração que ainda não foi encontrado indivíduos albinos de *B. occidentalis*, nem de *B. t. guaibensis*, nesta dissertação, a PCR-RFLP foi utilizada para detectar o possível cruzamento entre esses dois progenitores. Assim, do pareamento de *B. occidentalis* e *B. t. guaibensis*, os moluscos da geração F1 apresentaram perfil idêntico ao do seu respectivo progenitor, indicando completo isolamento reprodutivo. Com a manutenção dessas populações, no moluscário “Lobato Paraense”, será possível o acompanhamento das próximas gerações, pois caso haja homozigose recessiva para pigmentação, isto é, o aparecimento de exemplar albino, experimentos futuros poderão ser realizados utilizando esse marcador para confirmar nossos resultados.

Contudo, as semelhanças morfológicas e a afinidade refletida na reconstrução da filogenia molecular (Paraense, 1984; Spatz *et al.*, 1999 e Vidigal *et al.*, 2004) são evidências que sugerem uma ancestralidade comum para os moluscos do complexo *B. tenagophila*. Levando em conta que, quando populações de uma espécie divergem e se diversificam a ponto de evoluírem para novas espécies, estas últimas herdaram pelo menos parte das características da população ancestral (Paraense & Deslandes, 1956). E se o estabelecimento da barreira reprodutiva entre *B. t. guaibensis* e *B. occidentalis* é recente, talvez explique as afinidades entre os dois moluscos nos estudos filogenéticos. Além disso, pode haver linhagens diferentes dentro dos dois taxa, que não teriam estabelecido barreira reprodutiva. Este dado não pôde ser observado neste trabalho, uma vez que nos pareamentos realizados foram usados *B. occidentalis* de Minas Gerais, distante geograficamente do Rio Grande do Sul, origem de *B. t. guaibensis*.

Dos 15 pareamentos realizados, entre *B. t. guaibensis* (pigmentado) e *B. tenagophila* (albino), quatro (27%) apresentaram moluscos pigmentados, na geração F1 do progenitor *B. tenagophila* (albino), com perfil molecular de *B. t. guaibensis*. Sabendo-se que, em moluscos do gênero *Biomphalaria*, o albinismo é caracter recessivo, a ocorrência ou não da fertilização de ovos de albinos pelo esperma de melânicos foi realizada por Paraense (1981), para comprovar o completo isolamento reprodutivo entre *B. occidentalis* e *B. tenagophila*. Nesta dissertação, os descendentes dos pareamentos, além de analisados pelo caráter albinismo, foram analisados molecularmente, apresentando perfis moleculares distintos dos progenitores, no caso de efetivo cruzamento.

Diferentes espécies seriam populações com algum fator intrínseco que atuaria prevenindo os livres cruzamentos entre as populações (Mayr, 1949). Subespécies são populações com características gerais semelhantes e apresentam-se geneticamente distintas, geograficamente separadas e que cruzam livremente nas zonas de contato (Mayer *et al.*, 1953 Apud Wilson & Brown-JR, 1953). As semelhanças entre *B. t. guaibensis* e *B. tenagophila* descritas por Paraense (1984) com relação à concha e sistema genital; o fato de moluscos *B. t. guaibensis* estarem concentrados apenas em uma restrita área e o fato de cruzarem-se nos impele a confirmar a classificação de subespécie.

Com poucas exceções, desovas de *B. glabrata* albinos, no cruzamento com pigmentado de *B. glabrata*, geraram desovas com a presença de moluscos albinos e pigmentados, indicando alguma instabilidade no mecanismo de fecundação cruzada (Paraense, 1956). Mais tarde, Jarne *et al* (1993) analisando cruzamentos de pigmentados e albinos postulou que como os dois tipos de espermatozoides (os autoespermatozoides e os aloespermatozoides) não se misturam, eles devem diferir em algum aspecto na ordem da fecundação. Um dos aspectos pode ser a maturidade dos espermatozoides, uma vez que o aloespermatozóide quando chega para fecundação já está maduro, e por isso será o primeiro a ser utilizado na fecundação. Nos resultados aqui apresentados, nos quatro cruzamentos de *B. t. guaibensis* (pigmentado) com *B. tenagophila* (albino), dois produziram apenas *B. t. guaibensis* (pigmentados) nos 30 dias de isolamento do molusco pós-cruzamento e dois produziram moluscos pigmentados e albinos.

O cruzamento pode ser "unilateral", ou seja, só haverá transferência de espermatozoide de apenas um indivíduo para outro, sendo que um comporta-se como macho e o outro como fêmea (Paraense, 1959). Os machos, neste caso, seriam os doadores de espermatozoides e a incompatibilidade de cruzamento ocorre apenas na direção dos machos (Jarne *et al.*, 2010). Nesta dissertação, esta situação pôde ser verificada em *B. t. guaibensis* que se comportou como macho doando espermatozóide e *B. tenagophila* (albino) como fêmea, uma vez que, a geração F1 de *B. tenagophila* albino foi pigmentada, com perfil de *B. t. guaibensis*. Nesse cruzamento, o perfil molecular dos descendentes de *B. t. guaibensis* foi semelhante à de seu progenitor. O fato de *B. tenagophila* apresentar um prepúcio e bainha do pênis mais curto e mais grosso comparado com a subespécie, pode ser a barreira mecânica que impediu o cruzamento.

A teoria da especiação alopátrica foi demonstrada quando moluscos F1, do cruzamento de *B. glabrata* (Paulista, PE) com *B. tenagophila* albino (Joinville, SC), mostraram-se normais, vigorosos e férteis, quando comparados com a população F2, que se mostrou fraca e com a presença de indivíduos inférteis (Mello-Silva *et al.*, 1998). Nesta dissertação, as gerações F1 e F2 do cruzamento entre *B. t. guaibensis* e *B. tenagophila* albino, foram analisadas somente quanto a sua suscetibilidade. Estudos sistemáticos, mais aprofundados, quanto à fertilidade de gerações subsequentes e quanto à possibilidade de retrocruzamentos ainda não foram realizados, uma vez que, o número de F1 produzidos em nossos experimentos foi reduzido, somando-se ao fato da dificuldade de manter *B. t. guaibensis* em laboratório e ao curto período de tempo para realização dos experimentos.

Entretanto, na análise da suscetibilidade dos moluscos pigmentados das gerações F1 e F2, de *B. tenagophila* (suscetível) do cruzamento com *B. t. guaibensis* (resistente), observou-se que os mesmos não infectaram. Esses resultados corroboram estudos que apontam que a resistência à infecção a *S. mansoni* possui caráter dominante (Richards 1970; Rosa *et al.*, 2005). Rosa *et al.*, 2005 demonstraram resultado semelhante quando cruzaram moluscos suscetível (Joinville) e resistente (Taim) da mesma espécie *B. tenagophila*, obtendo apenas 0,6% de infectividade com a cepa LE de *S. mansoni* para moluscos da geração F1 e 7,2% para a geração F2.

Com relação à suscetibilidade de moluscos F1 do cruzamento de suscetíveis e resistentes, já havia sido demonstrado que moluscos F1, quando infectados com *S. mansoni* podem iniciar a eliminação de cercárias com até 10 meses (Lewis *et al.*, 1993). Isso reforça a importância da utilização da LS-PCR para detectar a presença de DNA de *S. mansoni* determinando precocemente a suscetibilidade de moluscos *Biomphalaria* (Jannotti-Passos *et al.*, 1997). Assim os moluscos das gerações F1 e F2 que morreram (20%) ao longo da infecção foram examinados, mostrando-se negativos quanto à presença de DNA de *S. mansoni* pela LS-PCR.

O fato de termos demonstrado, em condições experimentais, que *B. t. guaibensis* e os moluscos F1 gerados do seu cruzamento com *B. tenagophila* não se infectam com *S. mansoni* tem importância epidemiológica, uma vez que, afasta a possibilidade de focos da esquistossomose em regiões onde somente essa subespécie está presente. E ainda, foi demonstrado que o posicionamento de *B. t. guaibensis* como subespécie é válido, uma vez que houve cruzamento comprovado

entre a *B. t. guaibensis* e a espécie *B. tenagophila*, e que, há isolamento reprodutivo entre *B. t. guaibensis* e *B. occidentalis*.

Um dado importante a ser mencionado é a respeito da dificuldade de manutenção das colônias de *B. t. guaibensis* e de *B. occidentalis*. Esses moluscos apresentam poucas desovas e o número de moluscos que chegam ao estágio adulto é pequeno.

Nesta dissertação, algumas lacunas foram preenchidas e novas foram expostas. Dessa maneira, estudos sobre a classificação de resistente ou refratária de *B. t. guaibensis* a *S. mansoni* estão em andamento através da utilização da LS-PCR nas horas iniciais da infecção. Observando a geração F2, pretendemos analisar molecularmente o perfil dos albinos com o objetivo de encontrar o perfil de *B. t. guaibensis* para formação de colônia e futuramente realizar experimentos de pareamento com *B. tenagophila* pigmentado e *B. occidentalis*.

## **7 CONCLUSÕES**

- *Biomphalaria tenagophila guaibensis* não foi suscetível a *S. mansoni* quando exposta a 50 e 100 miracídios das cepas LE, AL e SJ;
- *Biomphalaria tenagophila guaibensis* apresentou isolamento reprodutivo quando pareado a *B. occidentalis*, subsidiando o status de subespécie;
- *Biomphalaria tenagophila guaibensis* (pigmentado) cruzou com *B. tenagophila* (albino), em 27% dos pareamentos realizados, comprovando o status de subespécie;
- A direção de transferência de espermatozóide, nos casos de cruzamento comprovado, foi de *B. t. guaibensis* em direção a *B. tenagophila*;
- Os moluscos das gerações F1 e F2 do cruzamento entre *B. t. guaibensis* e *B. tenagophila* não se infectaram quando expostas a 100 miracídios da cepa SJ de *S. mansoni*.

## **8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Adema CM, Hertel LA, Miller RD, Loker ES. A family of fibrinogen-related proteins that precipitates parasite-derived molecules is produced by an invertebrate after infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94 (16): 8691–6.

Barbosa FS. Cross-breeding of *Australorbis glabratus* and *Biomphalaria boissyi*. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1956; 50: 296–297.

Basch PF. Intermediate host specificity in *Schistosoma mansoni*. *Exp Parasitol* 1976; 39: 150-169.

Bayne CJ. Successful parasitism of vector snail *Biomphalaria glabrata* by the human blood fluke (trematode) *Schistosoma mansoni*: A 2009 assessment. *Molecular & Biochemical Parasitology* 2009; 165: 8–18.

Brasil. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica: diretrizes técnicas: Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose (PCE). 2<sup>nd</sup> ed. Brasília: Editora do MS, 2008.

Boycott A, Diver C, Carstang S, Turner F. The inheritance of sinistrality in *Limnaea peregra*. *Philos Trans Roynl Soc* 1930; 219: 51-131.

Cain GL. Studies on cross-fertilization and self-fertilization in *Limnaea stagnalis appressa* Say. *Biol Bulletin*. 1956; 111: 45-52.

Caldeira RL, Teodoro, TM, Gomes MFB, Carvalho OS. Preliminary studies investigating the occurrence of *Biomphalaria cousini* in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2010; 105(4): 485-487.

Caldeira RL, Jannotti-Passos LK, Lira PM, Carvalho, OS. Diagnostic of *Biomphalaria* snails and *Schistosoma mansoni*: DNA obtained from traces of shell organic materials. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99: 499–502.

Carvalho OS, Nunes IM, Caldeira RL. First Report of *Biomphalaria glabrata* in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998 93:39-40.

Coelho PM, Carvalho OS, Andrade ZA, Martins-Souza RL, Rosa FM, Barbosa L, et al. D. *Biomphalaria tenagophila*/*Schistosoma mansoni* interaction: premises for a new approach to biological control of schistosomiasis. Mem Inst Oswaldo Cruz 2004; 99: 109-111.

Coelho PMZ, Rosa FM, Maciel E, Negrao-Correa DA, Carvalho OS, Caldeira, RL, et al. Transmission control of schistosomiasis mansoni by introduction of a resistant strain of *Biomphalaria tenagophila* in areas where transmission is maintained by this species. Acta trop 2008; 108(2-3): 245-248.

Corrêa LR, Paraense WL. Susceptibility of *Biomphalaria amazonica* to infection with two strains of *Schistosoma mansoni*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1971; 13(6): 387-90.

Coyne J, Orr H. Patterns of speciation in *Drosophila*. Evolution 1989, 43:362-381.  
Coyne J, Orr H: "Patterns of speciation in *Drosophila*" revisited. Evolution 1997, 51:295-303.

Dillon RT, Wethington AR, Lydeard C. The evolution of reproductive isolation in a simultaneous hermaphrodite, the freshwater snail *Physa*. BMC Evol Biology 2011; 11:144.

Hillis DM. Molecular versus morphological approaches to systematics. Annu Rev Ecol Syst 1987; 18: 23-42.

Jannotti-Passos LK, Caldeira RL, Carvalho OS. Técnicas utilizadas no estudo dos moluscos do gênero *Biomphalaria* e na manutenção do ciclo de *Schistosoma mansoni*. In Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HL, editors. *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2008. P. 531-544.

Jannotti-Passos LK, Vidigal THDA, Dias-Neto E, Pena SDJ, Simpson AJG, Dutra WO, et al. PCR amplification of the mitochondrial DNA minisatellite region to

detect *Schistosoma mansoni* infection in *Biomphalaria glabrata* snails. J Parasitol 1997; 83: 395–399.

Jarne P & Auld J. Animals mix it up too: The distribution of self-fertilization among hermaphroditic animals. Evolution 2006; 60:1816-1824.

Jarne P, Pointier JP, David P. Biosystematics of *Biomphalaria* spp. with an emphasis on *Biomphalaria glabrata*. In: R Toledo and B. Fried, editors. *Biomphalaria: Snails and Larval Trematodes*. 1<sup>nd</sup> ed. Paris: Springer Science Business Media, 2011. P. 1-32.

Jarne P, Vianey-Liaud M, Delay B. Selfing and outcrossing in hermaphrodite freshwater gastropods (Basommatophora): where, when and why. Biol J Linn Soc 1993; 49:99–125.

Jones-Nelson O, Thiele EA, Minchella DJ. Transmission dynamics of two strains of *Schistosoma mansoni* utilizing novel intermediate and definitive hosts. Parasitol Res 2011; 109:675–687.

Kane RA, Rollinson D. Repetitive sequences in the ribosomal DNA internal transcribed spacer of *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma intercalatum* and *Schistosoma mattheii*. Mol Biol Parasitol 1994: 63, 153–156.

Knight M, Brindley PJ, Richards CS, Lewis FA. *Schistosoma mansoni*: use of a cloned ribosomal RNA gene probe to detect restriction fragment length polymorphisms in the intermediate host *Biomphalaria glabrata*. Exp Parasitol 1991; 73:285–294.

Larambergue M. Etude de l'auto fécondation chez les gastéropodes pulmonés. Bull Biol France et Belgique 1939; 73: 19-213.

Lewis FA, Richards CS, Knight M Cooper LA, Clark B. *Schistosoma mansoni* – analysis of an unusual infection phenotype in intermediate host snail *Biomphalaria glabrata*. Exp Parasitol 1993; 77(3): 349-361.

Lijtmaer D, Mahler B, Tubaro P. Hybridization and postzygotic isolation patterns in pigeons and doves. *Evolution* 2003; 57:1411-1418.

Lima LC, Soares DM, Guimarães CT. *Biomphalaria occidentalis* (Paraense, 1981) in the state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1993; 88: 289-292.

Martins-Souza RL, Pereira CA, Coelho PM, Negrão-Corrêa D. Silica treatment increases the susceptibility of the Cabo Frio strain of *Biomphalaria tenagophila* to *Schistosoma mansoni* infection but does not alter the natural resistance of the Taim strain. *Parasitol Res* 2003; 91: 500-507.

Mascara D, Morgante JS. Use of isozyme patterns in the identification of *Biomphalaria tenagophila* (D' Orbigny, 1835) and *B.occidentalis* (Paraense, 1981) (Gastropoda: Planorbidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1995; 90: 359–366.

Mayr E, Linsley EG, Usinger, RL. *Methods and principles of systematic zoology*. McGraw Hill, New York; 1953. Apud Paraense WL *Biomphalaria tenagophila guaibensis* ssp.n. from southern Brazil and Uruguay (Pulmonata: Planorbidae). I. Morphology. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1987; 79: 465-469.

Mayr E. *Systematics and the Origin of Species*. New York: Columbia University Press; 1942. Apud Wilson EO & Brown-JR WL. The subspecies concept and its taxonomic application. *Syst Biol* 1953: 2(3), 97-111.

Mayr, E. Geografic variation of adaptative caracteres in *Rana pipiens*, Schreber. *Evolution*. 1949: 3, 1-24.

Medronho RA, & Perez MA. Testes Diagnósticos. In: Medronho RA, Bloch KV, Luiz RR, Werneck GL, editores. *Epidemiologia*. 2<sup>nd</sup> ed. Rio de Janeiro: Atheneu 2009; P. 389-402.

Mello-Silva CC, Gault CE, da Costa VA, Barbosa FS. Possible hybridization of Brazilian planorbid snails and its importance in population dynamics. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998; 93:227-32.

Mendelson T. Sexual isolation evolves faster than hybrid inviability in a diverse and sexually dimorphic genus of fish (Percidae: Etheostoma). *Evolution* 2003; 57:317-327.

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

Palumbi SR. Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. In: Hillis DM, Moritz C, Mable BK, editors. *Molecular Systematics* 2<sup>nd</sup> ed. Massachusetts: Sinauer Associates Sunderland; 1996. P. 205–48.

Paraense WL. Taxonomia morfológica e taxonomia molecular. An Res do XII EBRAM; 2003 Rio de Janeiro, Brasil. P. 52.

Paraense WL & Corrêa LR. Differential susceptibility of *Biomphalaria tenagophila* populations to infection with a strain of *Schistosoma mansoni*. *J Parasitol* 1978; 64: 822–826.

Paraense WL & Corrêa LR. Probable extension of *Schistosoma mansoni* to southern most Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1987; 82: 577.

Paraense WL & Correa LR. Self-fertilization in the freshwater snails *Helisoma duy* and *Helisoma trivolvis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1988; 83:405-409.

Paraense WL & Deslandes N. Observations on the morphology of *Australorbis nigricans*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1955a; 53(1): 121-134.

Paraense WL, Corrêa LR. Susceptibility of *Biomphalaria peregrina* from Brazil and Ecuador to two strains of *Schistosoma mansoni*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1973; 15: 127-130.

Paraense WL, Corrêa LR. Unsusceptibility of *Biomphalaria occidentalis* to infection with a strain of *Schistosoma mansoni*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1982; 77: 55–58.

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

Paraense WL, Pereira O, Pinto DB. Um aspecto da ecologia do *Australorbis glabratus* que favorece a reinfestação dos criadouros. Rev Ser Esp Saúde Públ 1955: 575-581.

Paraense WL, Pointier JP, Delay B, Pernot AF, Incani RN, Balzan C, et al. *Biomphalaria prona* (Gastropoda: Planorbidae): a morphological and biochemical study. Mem Inst Oswaldo Cruz 1992; 87: 171–179.

Paraense WL. "*Biomphalaria amazonica*" and "*B. cousini*", two new species of neotropical planorbid molluscs. Rev Bras Biol 1966 Aug; 26 (2):115-26.

Paraense WL. A genetic approach to the systematics of planorbid molluscs. Evolution 1956; 10: 403-407.

Paraense WL. *Biomphalaria kuhniana* (Clessin, 1883), planorbid mollusc from South America. Mem Inst Oswaldo Cruz 1988; 83:1-12.

Paraense WL. *Biomphalaria occidentalis* spn from South America (Mollusca: Basommatophora: Pulmonata). Mem Inst Oswaldo Cruz 1981; 76: 199-211.

Paraense WL. *Biomphalaria tenagophila guaibensis* sspn from southern Brazil and Uruguay (Pulmonata:Planorbidae) I: Morphology. Mem Inst Oswaldo Cruz 1984; 79: 465-469.

Paraense WL. Distribuição de caramujos no Brasil. Bibl. Acad Min Med 1986; 117-128.

Paraense WL. Estado atual da sistemática dos planorbídeos brasileiros. Arq Mus Nac Rio de Janeiro 1975; 55: 105-128.

Paraense WL. Fauna planorbídica do Brasil. In Lacaz CS, Baruzzi GR, Siqueira JR, editors. Introdução à geografia médica do Brasil. São Paulo: Editora Universidade de São Paulo; 1972. P. 213-239.

Paraense WL. Fauna planorbídica do Brasil. Introd Geog Méd Brasil 1970: 213-238.

Paraense WL. One-sided reproductive isolation between geographically remote populations of a planorbid snails. Am nat 1959; 93: 93-101.

Paraense WL. Self and cross-fertilization in *Australorbis glabratus*. Mem Inst Oswaldo Cruz 1955; 53: 285-291.

Paraense WL. The sites of cross- and self-fertilization in planorbid snails. Rev Bras Etiol 1976; 36: 535-539.

Pellegrino J, Katz N. Experimental chemotherapy of *Schistosomiasis mansoni*. Adv Parasitol 1968; 6: 233-290.

Pepe MS, Caldeira RL, Carvalho OS, Muller G, Jannotti-Passos LK, Rodrigues AP, et al. *Biomphalaria* molluscs (Gastropoda: Planorbidae) in Rio Grande do Sul, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009; 104(5): 783-786.

Perlowagora-Szumlewicz A. Studies on the Biology of *Australorbis glabratus* Schistosome-bearing Brazilian snails Rev Bras Mal Doenças Trop 1958, sn: 462-529.

Preston, HB. Additions to the onomarine molluscan fauna of British and German East Africa and Lake Albert Edward. Annals and Mag Nat Hist 1907; 20 (7): 490-498.

Price T, Bouvier M. The evolution of F1 postzygotic incompatibilities in birds. Evolution 2002; 56:2083-2089.

Richards CS & Shade PC. The genetic variation of compatibility in *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni*. Parasitology. 1987; 73:1146–1151.

Richards CS. Genetics studies of a molluscan vector of schistosomiasis. *Nature* 1970; 227: 806-810.

Richards CS. *Schistosoma mansoni*: susceptibility reversal with age in the snails host *Biomphalaria glabrata*. Exp. Parasitol 1977; 42: 165–168.

Rollinson D & Simpson AJG, editors. The biology of schistosomes – from genes to latrines. London: Acad Press; 1987. P. 128-148.

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

Rosa FM, Godard ALB, Negrão-Correa D, Rodrigues HA, Carvalho OS, Caldeira RL, et al. *Biomphalaria tenagophila*: dynamics of populations of resistant and susceptible strains to *Schistosoma mansoni*, with or without pressure of the parasite. Mem Inst Oswaldo Cruz 2006; 101 (I): 247-251.

Russell S. Evolution of intrinsic post-zygotic reproductive isolation in fish. Ann Zool Fennici 2003; 40:321-329.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, et al. Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 1985; 230:1350–1354.

Santos MBL, Freitas JR, Correa MCR, Coelho PMZ. Suscetibilidade ao *Schistosoma mansoni* de “híbridos” de *Biomphalaria tenagophila* de Taim, RS, Cabo Frio, RJ, e Belo Horizonte, MG. Rev Inst Med Trop de São Paulo 1979; 21: 281-286.

Sasa M, Chippendale P, Johnson N. Patterns of postzygotic isolation in frogs. *Evolution* 1998; 52:1811-1820.

Souza CP & Jannotti-Passos LK. Resistance of *Biomphalaria occidentalis* from Varzea das Flores Dam, Minas Gerais, to *Schistosoma mansoni* infection detected by Low Stringency Polymerase Chain Reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001; 96(3): 381-383.

Spatz L, Vidigal THDA, Caldeira RL, Dias-Neto E, Gonzalez-Cappa SM, Carvalho, OS. Study of *Biomphalaria tenagophila tenagophila*, *B. t. guaibensis* and *B. occidentalis* by polymerase chain reaction amplification and restriction enzyme digestion of the ribosomal RNA intergenic spacer regions. *J Mollus Stud* 1999; 65, 143–149.

Teodoro TM, Jannotti-Passos LK, Carvalho OS, Grijalva M J, Baús EG, Caldeira RL. Hybridism between *Biomphalaria cousini* and *Biomphalaria amazonica* and its susceptibility to *Schistosoma mansoni*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2011; 106(7): 853-857.

Teodoro TM, Janotti-Passos LK, Carvalho OS, Caldeira RL. Occurrence of *Biomphalaria cousini* (Mollusca: Gastropoda) in Brazil and its susceptibility to *Schistosoma mansoni* (Platyhelminths: Trematoda). *Mol Phylogenet Evol* 2010; 57: 144-151.

Théron A, Coustau C. Are *Biomphalaria* snails resistant to *Schistosoma mansoni*? *J Helminthol* 2005; 79:187–191.

Tilley S, Verrell P, Arnold S. Correspondence between sexual isolation and allozyme differentiation: A test in the salamander *Desmognathus ochrophaeus*. *Proc Nat Acad Sci USA* 1990; 87:2715-2719.

Viaey-Liaud M, Dupouy J, Lancastré F, Nassi H. Constant use of allosperm by female-acting snails after successive cross-fertilization in *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda: Planorbidae). *Malacological Rev* 1991; 24: 73-78.

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

Vidigal THDA, Spatz L, Kissinger JC, Redondo RAF, ECR Pires, Simpson AJG, Carvalho OS. Analysis of the First and Second Internal Transcribed Spacer Sequences of the Ribosomal DNA in *Biomphalaria tenagophila* Complex (Mollusca: Planorbidae). Mem Inst Oswaldo Cruz 2004 99(2): 153-158.

Watts SF. An introduction and annotated bibliography. In: Bruun B, Aagaard-Hansen J, editors. The social context of schistosomiasis and its control. Genève: World Health Organization; 2008. P. VII–IX.

Webster JP, Woolhouse MEJ. Selection and strain specificity of compatibility in the snail schistosome system. Parasitology 1998; 123: S41–S56.

World Health Organization. Elimination of schistosomiasis from low-transmission areas. Report of a Who Informal Consultation; 2008 Aug 18-19; Salvador Brazil. HTM: NTD, PCT 2009: 2.

World Health Organization. Report on Schistosomiasis. Report of the Scientific Working Group meeting on Schistosomiasis: 2005 Nov 14–16; Geneva; Switzerland. TDR: SWG 2007.