

RENATO GRACIANO DE PAULA

**LEVANTAMENTO MALACOLÓGICO DO DISTRITO DE ANUTIBA NA
REGIÃO SUL DO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO E CLASSIFICAÇÃO
MOLECULAR DE *Biomphalaria* sp.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Medicina Veterinária do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Olavo dos Santos Pereira Júnior.

ALEGRE-ES

2010

RESUMO

A esquistossomose é uma doença infecto-parasitária de veiculação hídrica causada pelo trematódeo *Schistosoma mansoni*, sendo o homem o seu hospedeiro definitivo. Os hospedeiros intermediários para *S. mansoni* são moluscos do gênero *Biomphalaria* sp., sendo a classificação destes organismos baseada em aspectos morfológicos da concha e dos órgãos reprodutores. No entanto, existe uma grande dificuldade na identificação das espécies, devido a grande variabilidade destas características. A utilização de ferramentas moleculares é de extrema importância para a classificação destes moluscos, uma vez que permite a distinção de espécies indistinguíveis fenotipicamente. Este estudo descreve um levantamento malacológico realizado no distrito de Anutiba presente na região sul do estado do Espírito Santo. Os moluscos do gênero *Biomphalaria* sp. coletados foram armazenados em laboratório, sendo posteriormente realizado o teste de exposição à luz para determinar a taxa de infecção destes espécimes por *S. mansoni* e aplicação da técnica de PCR-RFLP para a classificação molecular dos moluscos. Todos os caramujos foram negativos quanto à infecção com o parasito *S. mansoni*. Este estudo relata o encontro de *Biomphalaria* sp., *Physa* sp., *Lymnaea* sp. e *Melanoides* sp. vivendo em simpatria. A aplicação de um questionário destinado a comunidade presente na área em estudo revelou uma alta taxa de prevalência da doença. A amplificação do DNA genômico extraído dos caramujos com os *primers* iniciadores ETTS1 e ETTS2 produziu uma banda com aproximadamente 1200pb. Após a clivagem do DNA amplificado com a enzima de restrição *Ddel* foram observadas duas bandas com peso de aproximadamente 850pb e 550pb, identificando assim os caramujos como pertencentes à espécie *B. tenagophila*. Estes resultados ressaltam a importância da utilização de ferramentas moleculares em estudo de caracterização dos hospedeiros intermediários para *S. mansoni*, uma vez que a identificação morfológica nem sempre é eficaz para promover a diferenciação das espécies.

Palavras-chave: *Schistosoma mansoni*, epidemiologia, endemia, saúde pública, biologia molecular.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Histórico e epidemiologia de Esquistossomose no Brasil

As esquistossomíases constituem-se doenças de alta endemicidade na Ásia, África, América do Sul e Ilhas do Caribe (REY, 2001). A esquistossomose mansônica é uma doença infecto-parasitária de veiculação hídrica própria de áreas rurais (BARBOSA et al., 2000; MARTINS JÚNIOR; BARRETO, 2003), causada pelo trematódeo *Schistosoma mansoni*, sendo o homem o seu hospedeiro definitivo (PASSOS et al., 1998; FUNASA, 2002). De acordo com Chitsulo e colaboradores (2000) existem aproximadamente 652 milhões de pessoas em risco de infecção e 193 milhões de pessoas infectadas por todos os tipos de esquistossomose, sendo que 85% do número de pessoas infectadas são estimadas no continente africano, onde os esforços para o controle da doença são ineficazes. De acordo com Krettli (2008) a esquistossomose é endêmica em 74 países com 600 milhões de indivíduos em risco de infecção e 200 milhões de indivíduos infectados.

Acredita-se que a esquistossomose tenha sido trazida da África para o Brasil no século XVI, nos primórdios da colonização europeia, em virtude do tráfico de escravos oriundos de regiões de alta endemicidade da doença (MAGALHÃES; DIAS, 1944; BARBOSA et al., 1996; RODRIGUES; LOUZADA, 2003; SOUZA et al., 2006; PRATA, 2008). De 1995 a 2005, segundo dados do Programa de Controle da Esquistossomose do Ministério da Saúde foram notificados, no Brasil, mais de um milhão de casos de esquistossomose, dos quais 27,5% notificados no estado de Minas Gerais. Existem também outros focos da doença disseminados pelo país, principalmente nos estados da Bahia e Espírito Santo (MARTINS, 2009).

No Brasil, estima-se a existência de 8 a 10 milhões de indivíduos infectados (AMARAL; PORTO, 1994), fazendo desta doença um dos mais sérios problemas de saúde pública nos países em desenvolvimento (COURA; AMARAL, 2004). Nas regiões Nordeste e Sudeste a parasitose é amplamente distribuída, enquanto que nas regiões Norte e Sul as áreas endêmicas são mais dispersas e isoladas (TELES, 2005). Os estados da Bahia e Minas Gerais são, segundo o Ministério da Saúde,

responsáveis por 70% dos casos da doença no país (RODRIGUES; LOUZADA, 2003). As áreas endêmicas estão localizadas nos estados do Maranhão, Pará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo e na cidade do Rio de Janeiro (SOUZA et al., 2001) (ANEXO A).

De acordo com Ferreira e Silva (2007), no período de 1980 a 2003, ocorreram 14.463 óbitos por esquistossomose no Brasil. Neste período foi registrada uma redução de 62,9% do coeficiente de mortalidade por esquistossomose. Tal redução pode estar relacionada à eficácia das medidas de controle da doença no país, sobretudo às estratégias de controle da morbidade. No entanto, o surgimento de novas áreas com potencial para transmissão da doença continua em expansão (CARMO; BARRETO, 1994; BARBOSA et al., 2000).

O ritmo acelerado de ocupação dos espaços urbanos, principalmente através dos fluxos migratórios internos, é responsável pelo agravamento do quadro sanitário e de pobreza das grandes cidades, originando novos problemas de saúde e ampliando a demanda por serviços assistenciais (SILVA, 1985; CARMO; BARRETO, 1994; CARVALHO et al., 1997; RODRIGUES; LOUZADA, 2003). Sendo assim, pode-se afirmar que a esquistossomose, por ser uma doença com forte associação com as variações ambientais e socioeconômicas, vem se urbanizando nas últimas décadas e encontra-se em franca expansão em todo o território nacional, agregada à falta de saneamento básico e de educação sanitária da população (COIMBRA JÚNIOR et al., 1984; BARBOSA et al., 1996; PASSOS et al., 1998; KATZ; PEIXOTO, 2000).

O ciclo da doença é relativamente simples, mas de enorme complexidade social que depende da existência de indivíduos eliminando ovos do parasito, de coleções hídricas habitadas por moluscos suscetíveis e das necessidades cotidianas das pessoas (MARTINS, 2009). De acordo com Massara e colaboradores (2004), as variáveis sócio-demográficas e atividades ao ar livre associada ao contato da água sempre foram associados com infecção pelo *S. mansoni*.

Os programas de controle da esquistossomose no Brasil têm contribuído para a redução da prevalência e das formas graves da doença, mas não têm impedido que novos focos apareçam especialmente nas áreas periféricas dos grandes centros urbanos do país (VASCONCELOS et al. 2009).

No estado do Espírito Santo, entre os anos de 1999-2002, o número de casos de Esquistossomose variaram de 3388 a 5292 (ESPÍRITO SANTO, 2004). Dos 78

municípios do estado, 20 são considerados endêmicos para esquistossomose, 19 municípios são considerados focais ou vulneráveis e 39 indenes (RODRIGUES; LOUZADA, 2003) (ANEXO B). Diante deste preocupante quadro, a Secretaria de Estado da Saúde (SESA) juntamente com o Conselho Estadual de Saúde (CES) elaboraram o PLANO ESTADUAL DE SAÚDE - QUADRIÊNIO 2004-2007. Neste documento várias ações são propostas para reduzir a prevalência de esquistossomose no estado. Os principais objetivos e ações deste documento, quanto à esquistossomose são: monitoramento vetorial com realização de pesquisa malacológica em coleções hídricas, inquéritos coproscópicos em localidades endêmicas e focais, investigação de casos positivos e avaliação dos indicadores de morbi-mortalidade nos municípios endêmicos (ESPÍRITO SANTO, 2004).

1.2. Sistemática e distribuição geográfica de *Schistosoma mansoni*

A Subclasse Digenea (Platyhelminthes, Neodermata, Trematoda) está entre os maiores grupos de parasitos que alcançaram sucesso evolutivo (OLSON et al., 2003). A Superfamília Schistosomatoidea compreende os trematódeos parasitos do sangue do homem e de vertebrados inferiores, sendo pertencente à Ordem Strigeata, que engloba indivíduos monóicos e dióicos, e que tem cercárias com cauda bifurcada. Esta Ordem possui quatro famílias: Apocotylidae, Sanguinicolidae, Spirorchidae e Schistosomatidae. Somente a última apresenta interesse médico e sanitário, já que abriga parasitos do sistema sanguíneo dos vertebrados de sangue quente (REY, 2001). A família Schistosomatidae pode ser dividida em duas subfamílias: Bilharziellinae (sem dimorfismo sexual) e Schistosominae (com dimorfismo sexual) (PESSOA, 1969).

Estes helmintos são hermafroditas, exceto *S. mansoni*, o qual apresenta acentuado dimorfismo sexual, sendo a fêmea delgada e cilíndrica, enquanto o macho apresenta um corpo mais largo com uma cavidade, o canal ginecóforo, o qual serve de abrigo para a fêmea durante a cópula (PESSOA, 1969; REY, 2001).

As principais espécies existentes dentro do gênero *Schistosoma* são: *S. bovis*, *S. mattheei*, *S. intercalatum* e *S. rodhaini* na África, *S. spindale* e *S. mekongi*

na Índia. Quanto ao homem, as três principais espécies responsáveis pela transmissão da esquistossomose são: *S. mansoni* (América, África, Antilhas), *S. haematobium* (África) e *S. japonicum* (Indonésia, China e Filipinas) (PESSOA, 1969; REY, 2001; OMS, 2005 apud PEPE, 2006). Em determinadas áreas geografias restritas, as espécies *S. intercalatum*, *S. mekongi* e *S. malayensis*, também podem acometer humanos (ACHA; SZYFRES, 2003).

Os vermes adultos de *S. mansoni* localizam-se no interior dos vasos sanguíneos, habitando preferencialmente as vênulas da parede do intestino grosso e ramificações das veias mesentéricas, causando uma infecção denominada esquistossomose mansônica ou intestinal, xistose, doença dos caramujos ou barriga d'água. Sua distribuição geográfica muitas vezes é condicionada pela presença de seus hospedeiros intermediários - moluscos do gênero *Biomphalaria*. Já o *S. haematobium* é um parasita vesical, produzindo problemas no sistema urinário, sendo sua distribuição predominantemente africana podendo estender-se até a região do Mediterrâneo. Os moluscos vetores são espécies do gênero *Bulinus*. Por outro lado, o *S. japonicum* causa a esquistossomose japônica, possuindo como hospedeiros intermediários moluscos prosobrânquios do gênero *Oncomelania* (REY, 2001).

1.2.1. O ciclo de vida de *Schistosoma mansoni*

O ciclo de vida deste parasito é heteroxeno, ou seja, necessita de um hospedeiro intermediário (reprodução assexuada) e um hospedeiro definitivo (reprodução sexuada) (SCHNEIDER; ZELCK, 2001) (ANEXO C). As fêmeas do parasito põem seus ovos no interior dos vasos sanguíneos (vênulas da parede do intestino grosso e ramificações das veias mesentéricas), os quais posteriormente atravessam a mucosa intestinal sendo eliminados nas fezes. Na água, os ovos viáveis eclodem, liberando pequenas larvas – miracídeos (REY, 2001; FUNASA, 2002). A viabilidade dos miracídeos é de aproximadamente 24h (PASSOS et al., 1998). Vários fatores interferem na eclosão dos miracídeos, no entanto, luz e

temperatura são os mais determinantes. A temperatura ótima para eclosão é em torno de 28°C (PESSOA, 1969; FONSECA, 2009).

Estas larvas nadam ativamente na água em busca de seu hospedeiro intermediário (PASSOS et al., 1998). A penetração dos miracídios nos moluscos ocorre preferencialmente pela região das antenas ou pé. Após penetrar no hospedeiro intermediário, o miracídio dá início aos estádios posteriores de desenvolvimento. Células germinativas presentes no interior do miracídio multiplicam-se e dão origem a um esporocisto primário, o qual se divide formando esporocistos filhos. Estes por sua vez, são liberados do esporocisto primário e migram até a glândula digestiva (hepatopâncreas) do molusco, onde ocorre a formação das inúmeras cercárias (GRYSEELS et al., 2006). As cercárias já formadas migram para a região da pseudobrânquia, onde provocam a formação de pequenas vesículas no tegumento dos moluscos. Ao romperem-se as vesículas liberam as cercárias para o exterior. Os moluscos infectados liberam cercárias de forma intermitente, sendo a luz e a temperatura fatores imprescindíveis para a eliminação das cercárias (REY, 2001).

Após a eliminação, as cercárias nadam ativamente na tentativa de encontrarem um hospedeiro definitivo viável para a penetração. Seis pares de glândulas (glândulas de penetração) liberam proteases que permitem as cercárias penetrar toda camada córnea da pele do hospedeiro. Uma vez nos tecidos do hospedeiro, o corpo cercariano transforma-se em esquistossômulo, o qual acaba por penetrar um vaso cutâneo, sendo passivamente arrastado pela circulação sanguínea em direção ao coração e pulmões. Nos vasos pulmonares, os esquistossômulos tornam-se mais delgados e longos, o que facilita sua migração através dos órgãos até chegar ao fígado (GRYSEELS et al., 2006; FONSECA, 2009).

Ao atingirem a parte esquerda do coração, os esquistossômulos são lançados na circulação geral indo até o sistema porta-hepático, onde se nutrem com o sangue do hospedeiro e migram para as veias mesentéricas, ocorrendo aí o desenvolvimento para vermes adultos, o acasalamento e postura de ovos pela fêmea. Estes ovos podem então ser eliminados nas fezes do hospedeiro e contaminar o ambiente, dando início a um novo ciclo de infecção (GRYSEELS et al., 2006).

1.3. Caracterização e distribuição geográfica do hospedeiro intermediário

Os moluscos hospedeiros intermediários do parasito *S. mansoni* pertencem à Classe Gastropoda, Suclasse Pulmonata, Ordem Basommatophora (moluscos de água doce), a qual é dividida em cinco famílias: Lymnaeidae, Bulinidae, Planorbidae, Physidae e Ancyliidae (CARVALHO et al., 2005).

A família Planorbidae da qual fazem parte os moluscos do gênero *Biomphalaria*, compreende moluscos pulmonados de água doce, apresentando um par de tentáculos, concha enrolada em espiral plana e sem opérculo (PESSOA, 1969; REY, 2001). São animais hermafroditas, constituídos por um sistema canalicular composto por duas partes, permitindo tanto a reprodução cruzada quanto a autofecundação (PARAENSE, 1955). O aparelho genital muitas vezes é empregado na classificação morfológica destes espécimes (PARAENSE; DESLANDES, 1955; PESSOA, 1969; PASSOS et al., 1998; REY, 2001).

Os ovos são postos individualmente e envolvidos por uma cápsula gelatinosa e transparente, a qual permite sua aderência a um substrato, que pode ser folhas de plantas aquáticas, ou qualquer outra superfície sólida flutuante ou submersa (PESSOA, 1969; PASSOS et al., 1998; REY, 2001).

O gênero *Biomphalaria* (Preston, 1910) abrange cerca de vinte espécies, amplamente distribuídas na África, Américas e Ásia Ocidental (PARAENSE, 1975). As principais espécies responsáveis pela transmissão da esquistossomose mansônica nas Américas são: *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria tenagophila*, *Biomphalaria straminea* (PESSOA, 1969; SOUZA et al., 1997; REY, 2001; MARTINS, 2009). Em outras regiões, como na África e na Ásia Ocidental, outras espécies de *Biomphalaria* são responsáveis pela manutenção do ciclo biológico de contaminação com *S. mansoni* (REY, 2001).

Teles e Vaz (1987), Silva e colaboradores (1994), Souza e colaboradores (1995), Carvalho e colaboradores (1998), Giovanelli e colaboradores (2001) afirmam que *B. glabrata* é a espécie mais adaptada a veiculação de *S. mansoni*, e segundo Paraense (1983a) é um indicador da presença de esquistossomose em regiões onde são encontradas. Para Rey (2001) e Paraense (2001), *B. glabrata* representa a principal espécie que transmite a esquistossomose nas Américas.

No Brasil, dez espécies e uma subespécie de *Biomphalaria* podem ser encontradas, sendo algumas vastamente distribuídas e outras limitadas a regiões específicas (PARAENSE, 1983a; SOUZA et al., 2001; CALDEIRA et al., 2009). De acordo com Paraense (1973), duas espécies, *Biomphalaria amazonica* e *Biomphalaria peregrina*, podem ser experimentalmente infectadas com larvas de *S. mansoni*. Em contrapartida, somente *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea* podem ser encontradas naturalmente infectadas (PAZ, 1997; PASSOS et al., 1998; VIDIGAL et al., 1998a; JANNOTTI-PASSOS; SOUZA, 2000; TELES, 2005) (Tabela 1).

A espécie *B. straminea* é um importante vetor da esquistossomose na região nordeste do Brasil, apresentando taxas baixas de infecção e alta densidade nos criadouros (PARAENSE; CORRÊA, 1985; BARBOSA; SILVA, 1992; MOZA et al., 1998). Segundo Valadão e Milward-de-Andrade (1991), esta espécie, em algumas regiões do nordeste, é o único vetor. Já Carvalho e colaboradores (1998) acreditam ser a espécie que melhor se adaptou as variações climáticas. Coutinho e colaboradores (1992) apontam como responsável pela disseminação destes moluscos no nordeste brasileiro, a construção de barragens e do amplo desenvolvimento dos sistemas de irrigação. Neste trabalho a taxa de positividade dos caramujos para infecção com *S. mansoni* foi de apenas 0,5%. Favre e colaboradores (2002) relatam uma taxa de infecção natural de *B. straminea*, em Pernambuco, de apenas 0,4%. Em outras áreas, entretanto, a espécie transmissora da doença é a *B. glabrata* (FAVRE et al., 2002; COUTO, 2005; ARAÚJO et al., 2007).

Souza e colaboradores (1996) apontam *B. straminea* como potencial causadora de um novo foco da doença na região urbana de Belo Horizonte. Woodruff e colaboradores (1985) relatam a introdução e rápida dispersão de *B. straminea* em Hong-Kong (China). Na Venezuela, *B. straminea* é o segundo hospedeiro intermediário mais importante na transmissão da esquistossomose (NOYA et al., 1999).

Entre os planorbídeos hospedeiros intermediários do *S. mansoni*, as três principais espécies (*B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*) ocorrem em Minas Gerais (SOUZA et al., 2006). Contudo, *B. glabrata* é responsável pela grande maioria dos focos (SOUZA et al., 2001).

Tabela 1. Espécies e subespécie brasileiras de *Biomphalaria*, distribuição geográfica e infectividade por *Schistosoma mansoni*.

Espécies	Distribuição geográfica no Brasil ^a	Infectividade por <i>Schistosoma</i>
<i>B. glabrata</i> (Say, 1818)	Pára, Maranhão, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Alagoas, Paraíba, Pernambuco, Sergipe, Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Goiás, Distrito Federal, Paraná e Rio Grande do Sul	Suscetível (Lutz, 1916)
<i>B. straminea</i> (Dunker, 1848)	Amazonas, Acre, Roraima, Pará, Maranhão, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Alagoas, Paraíba, Pernambuco, Sergipe, Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Distrito Federal, Paraná e Rio Grande do Sul	Suscetível (Lutz, 1934)
<i>B. tenagophila</i> (Orbigny, 1835)	Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Goiás, Distrito Federal, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul	Suscetível (Lutz, 1918)
<i>B. peregrina</i> (Orbigny, 1835)	Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Distrito Federal, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul	Infecção Experimental (Paraense e Corrêa, 1973)
<i>B. amazonia</i> Paraense, 1966	Amazonas, Acre, Rondônia, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul	Infecção Experimental (Corrêa e Paraense, 1971)
<i>B. intermedia</i> Paraense e Deslandes, 1962	São Paulo, Minas Gerais e Mato Grosso do Sul	Refratária (Paraense com. pes.)
<i>B. occidentalis</i> Paraense, 1981	Amazonas, Acre, Rondônia, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul	Refratária (Paraense e Corrêa, 1982; Coimbra Jr. e Engel, 1982)
<i>B. schrammi</i> (Crosse, 1864)	Todo território brasileiro, exceto Amazonas, Paraná e Rio Grande do Sul	Refratária (Paraense et al., 1964)
<i>B. oligoza</i> Paraense 1974	São Paulo, Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul	Refratária (Paraense com. pes.)
<i>B. kuhniiana</i> (Clessin, 1883)	Pará	Refratária (Floch e Fauran, 1954)
<i>B. tenagophila</i> <i>guaibensis</i> Paraense, 1984	Rio Grande do Sul	Refratária (Paraense e Corrêa, 1987)

^a Souza e Lima (1997)

Tradução nossa. Fonte: Caldeira et al. (2009).

Coura-Filho e colaboradores (1995) em estudo realizado em Ravena (Minas Gerais) constataram a presença de moluscos *B. glabrata* e *B. tenagophila*, em respectivamente, 42,40% e 57,59% dos pontos de coleta, sendo que os espécimes de *B. glabrata* apresentaram taxas variáveis de infecção por *S. mansoni*, enquanto, nenhum *B. tenagophila* estava contaminado. Em estudo posterior na região de Taquaraçu de Minas (Minas Gerais), Coura-Filho (1998) relata a presença das três principais espécies hospedeiras de *S. mansoni*, sendo que somente *B. glabrata* apresentava-se infectada. Silva e colaboradores (1994) relatam uma alta frequência de *B. tenagophila* no Lago Soledade (Minas Gerais), sendo que 0,2% apresentaram-se positivos para *S. mansoni*. Em levantamento malacológico realizado na região de Mariana (Minas Gerais), 1,18% dos planorbídeos *B. glabrata* coletados estavam infectados com *S. mansoni* (SOUZA et al., 2006). Vasconcelos e colaboradores (2009) identificaram na região de Sabará (Minas Gerais) moluscos pertencentes as três principais espécies hospedeiras, sendo que a maioria, 49,52%, pertence à espécie *B. tenagophila*. Relata-se também neste estudo, a substituição de populações de *B. glabrata* por *B. tenagophila*. Massara e colaboradores (2004), em estudo realizado em Jaboticatubas (Minas Gerais), também descrevem a presença de *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea* destacando a importância destas espécies na manutenção do ciclo de contaminação com *S. mansoni*.

Katz e Carvalho (1983) registram os primeiros casos de esquistossomose autóctone na região de Itajubá (Minas Gerais), sendo que as espécies *B. tenagophila* e *B. peregrina* encontradas em seu levantamento malacológico mostraram-se negativas para infecção com *S. mansoni*. Somente em 1985, Carvalho e colaboradores descrevem o primeiro encontro de *B. tenagophila* naturalmente infectada nesta região. Sendo assim, Itajubá até então considerada como indene torna-se um foco em potencial para transmissão da doença.

A espécie *B. tenagophila* é segunda mais importante na transmissão de *S. mansoni* no Brasil (PARAENSE; CORRÊA, 1978), sendo importante hospedeira na região Sul (PARAENSE, 1984) e em parte da região Sudeste (PARAENSE, 1989; TELES et al., 1991; PASSOS et al., 1998; TELES, 2005; SOUZA et al., 2007; VASCONCELOS et al., 2009). O estado de São Paulo apresenta uma grande área colonizada por *B. tenagophila*, no entanto, outras espécies tais como *B. occidentalis* e *B. straminea* podem ser encontradas (TELES, 1989; 1996).

Nunes e Rodrigues (2007), após levantamento malacológico realizado em Belém (Pará), descrevem a presença de duas espécies hospedeiras – *B. glabrata* (20,22%) e *B. straminea* (4,71%), sendo encontrado um percentual de 8,8% de caramujos positivos para *S. mansoni*.

Em Rondônia, a presença de *B. amazonica* é relatada após a realização de estudos para conhecer a distribuição das espécies de *Biomphalaria* e promover a caracterização ecológica dos criadouros (COIMBRA JÚNIOR et al., 1984). Esta espécie já havia sido anteriormente descrita nesta região (PARAENSE, 1982). Esse mesmo autor expõe também a presença de *B. occidentalis* na cidade de Ouro Preto D'Oeste.

No Espírito Santo, as três principais espécies vetores da esquistossomose mansônica são encontradas (PASSOS et al., 1998; RODRIGUES; LOUZADA, 2003). Estudos realizados na região de Afonso Cláudio relatam a presença de *B. glabrata* naturalmente infectado, com taxas de infecção que variam de 0,25 a 4,79% (BARBOSA et al., 1993).

Paraense e colaboradores (1983b), em estudo realizado no Espírito Santo relatam uma maior abundância de *B. tenagophila*, seguida por *B. glabrata*, *B. schrammi* e *B. straminea*. De acordo com este autor, *B. glabrata* coincide com a ocorrência da doença, não sendo conhecidos os papéis de *B. tenagophila* e *B. straminea* na transmissão da parasitose. Nos municípios de Ecoporanga, Mucurici, Montanha, São Mateus, Nova Venécia, Mantenópolis, Pancas, Linhares, Cdatina, todos pertencentes ao estado do Espírito Santo, foram encontrados espécimes representantes das três principais espécies hospedeiras para o *S. mansoni*. No entanto, vários outros municípios apresentam uma ou duas destas espécies. Em Alegre, somente *B. tenagophila* foi relatada.

As espécies hospedeiras intermediárias para o parasito *S. mansoni* aqui descritas demonstram considerável capacidade de resistência e sobrevivência em ambientes muito poluídos, o que certamente é um dos fatores indispensáveis para a preservação dos riscos decorrentes da transmissão ambiental de *S. mansoni* (SOUZA et al., 2007). Teles (1989), assinala o encontro de *B. tenagophila* em uma área onde o nível de poluição é o mais elevado do estado de São Paulo, demonstrando ser uma espécie altamente resistente às alterações ambientais.

1.4. Métodos moleculares para o estudo de moluscos do gênero *Biomphalaria*

A classificação morfológica de moluscos planorbídeos hospedeiros para *S. mansoni* é baseada em aspectos morfológicos da concha e dos órgãos reprodutores (PARAENSE, 1981; 1984; 1988). No entanto, existe uma grande dificuldade na identificação das espécies, principalmente, pela grande variabilidade destas características, as quais são determinadas pela influência do ambiente na forma e tamanho da concha, pela pequena dimensão dos espécimes e pela semelhança entre algumas espécies (VIDIGAL et al., 1998a). Sendo assim, novas ferramentas para classificação destes vetores parasitológicos devem ser empregadas.

Mascara e Morgante (1991), em estudo para caracterização da estrutura genética de populações de *B. tenagophila* utilizando polimorfismo isoenzimático, constataram a presença de sete locos polimórficos nas populações estudadas, entretanto, o nível de heterozigotidade averiguado foi baixo. Esta mesma técnica foi utilizada para distinção entre *B. tenagophila* e *B. occidentalis* (MASCARA; MORGANTE, 1995), as quais são espécies extremamente semelhantes morfológicamente (PARAENSE, 1981). Já Bailey e colaboradores (1986) descrevem a distinção destas espécies através de padrões eletroforéticos da hemolinfa dos moluscos.

O uso de métodos moleculares tornou-se importante para o estudo de caramujos de água doce. Lewis e colaboradores (1997) empregam as técnicas de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) para analisar linhagens de caramujos resistentes e suscetíveis à infecção por *S. mansoni*. Os padrões RFLP obtidos não apresentaram qualquer relação com a resistência/susceptibilidade dos caramujos. Já os perfis gerados através dos *primers* arbitrários geraram padrões diferenciais entre caramujos suscetíveis e resistentes. Neste trabalho um marcador com 1100bp foi gerado e permitiu a identificação de caramujos suscetíveis. A técnica de PCR utilizando *primers* arbitrários (AP-PCR) já havia sido empregada em trabalhos anteriores para a caracterização de muitos outros organismos (WELSH; McCLELLAND, 1990; WILLIAMS et al., 1990; CROSSLAND et al., 1993; SPADA et al. 2002).

Vidigal e colaboradores (1994) utilizaram a técnica AP-PCR para estudar a variabilidade intra e interpopulacional de *B. glabrata* de diferentes regiões

geográficas do Brasil. Como resultados, detectaram um restrito polimorfismo intrapopulacional e elevado polimorfismo interpopulacional. Dias Neto e colaboradores (1993) e Vidigal e colaboradores (1996), propuseram uma nova técnica, baseada na amplificação de regiões gênicas do rRNA 18S, a qual apresenta um baixo polimorfismo intraespecífico. Segundo Vidigal e colaboradores (1998a), o notável polimorfismo intraespecífico pode tornar difícil a diferenciação das espécies de caramujos através da técnica de AP-PCR.

A LS-PCR (*Low Stringency Polymerase Chain Reaction*) utiliza dois *primers* específicos, sendo a reação conduzida sob baixas temperaturas de anelamento. Esta técnica foi inicialmente utilizada para a determinação sexual de parasitos trematódeos *S. mansoni* (DIAS NETO et al., 1993) e para a identificação específica de *B. glabrata* e *B. tenagophila* (VIDIGAL et al., 1996). Spatz e colaboradores (1998; 1999), considerando o elevado grau de semelhanças morfológicas e moleculares, agruparam *B. tenagophila tenagophila*, *B. occidentalis* e *B. t. guaibensis* em um complexo conhecido como *Biomphalaria tenagophila*. Vidigal e colaboradores (2004a) descrevem resultados semelhantes. De acordo com Pires e colaboradores (1997), LS-PCR demonstrou ser uma técnica muito sensível ao permitir a separação de duas espécies fenotipicamente indistinguíveis – *B. tenagophila* e *B. occidentalis*. A utilização da técnica de LS-PCR também permitiu a identificação de *B. occidentalis* resistentes à infecção por *S. mansoni* (SOUZA; JANNOTTI-PASSOS, 2001).

Outra técnica que tem sido muito utilizada para estudo de diversos organismos é a PCR-RFLP (HOPE; McMANUS et al., 1994; GASSER et al., 1996; CALDEIRA et al., 1998; SPATZ et al., 2000; VIDIGAL et al., 2001; SOHN et al., 2003; CARVALHO et al., 2004; PEPE et al., 2009). PCR-RFLP baseia-se na amplificação específica de determinada sequência de DNA pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e posterior digestão do fragmento obtido com enzimas de restrição – RFLP (VIDIGAL et al., 1998b).

Outra estratégia utilizada tem sido o estudo das regiões espaçadoras transcritas internas (ITS1 e ITS2) pertencentes à região de DNA ribossomal (rDNA). Trata-se de uma região cistrônica a qual apresenta sequências referentes à 18S, ITS1, 5.8S, ITS2, e 28S, e demonstra elevado nível de divergência em relação às sequências flanqueadoras, sendo utilizadas para diferenciar espécies afins (CHENG et al., 2006) (APÊNDICE A). Segundo Rollinson e colaboradores (1998), as regiões

espaçadoras são menos conservadas em relação às regiões codificadoras. Chen (2006), em estudo realizado para analisar a estrutura genética de moluscos bivalves da Família Veneridae, revelou uma maior similaridade das sequências ITS2 entre as espécies quanto comparadas com as sequências ITS1.

Para as análises do perfil de restrição através da técnica de RFLP várias enzimas de restrição têm sido utilizadas, sendo as principais: *AluI*, *DedI*, *HaeIII*, *MnII*, *MspI*, *RsaI* e *Sau3aI*. No entanto, somente *DedI* e *HaeIII* produziram perfis espécies-específicos para *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea* (VIDIGAL et al., 1998a). A amplificação das regiões flangeadoras das sequências ITS (ETTS1 e ETTS2) e posterior digestão do fragmento gerado utilizando *DedI*, gerou perfis de restrição que permitiram a diferenciação das espécies *B. kuhniana*, *B. straminea*, *B. intermedia* e *B. peregrina* (CALDEIRA et al., 1998). Vidigal et al. (2004b) destacam o uso da enzima *HpaII* para gerar perfis espécie-específicos que permitem a diferenciação de *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*.

Rosa e colaboradores (2004) comprovaram através de PCR-RFLP a herança de um marcador molecular de aproximadamente 350pb presente somente na linhagem resistente de *B. tenagophila* Taim (Rio Grande do Sul), após realização de fecundação cruzada com outra linhagem suscetível de caramujos de Joinville.

Caldeira e colaboradores (2001) após PCR utilizando *primers* ancorados às regiões microssatélites - SSR-PCR (ZIETKIEWICZ et al., 1994), conseguiram perfis para distinguir as espécies *B. kuhniana*, *B. straminea*, *B. intermedia*, espécies que devido à grande semelhança morfológica, foram agrupadas em um complexo determinado *B. straminea* (PARAENSE, 1988).

Vidigal e colaboradores (2002a) através do estudo do gene mitocondrial citocromo oxidase I (COI) utilizando a técnica PCR-RFLP obtiveram perfis de restrição que permitiram a identificação de moluscos *B. glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila*. Esta metodologia já havia sido utilizada por outros autores para o estudo de outros organismos (LOVETTE et al., 1999; MATSUMOTO; HAYAMI, 2000; CAMPBELL et al., 2000). Segundo Anderson (2001), a análise de um loco único pode causar resultados duvidosos, sendo assim, a utilização do gene mitocondrial permite a obtenção de resultados mais confiáveis para caracterização das espécies.

Vidigal e colaboradores (2002b) utilizando a metodologia de Multiplex-PCR para o estudo da região ITS2 obtiveram perfis diferentes que permitiram distinção entre *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*. Esta técnica consiste na utilização

de um *primer* para ancorar na região conservada do gene 5.8S e outros três *primers* espécie-específicos que anelam em regiões conservadas de 28S, as quais flanqueiam a região ITS2. Esta técnica também tem sido utilizada em estudos para identificação de outros organismos (FUJITA et al., 2001; MOSQUERA et al., 2002; PÉLANDAKIS; PERNIN, 2002; JANNOTTI-PASSOS et al., 2006).

A utilização de ferramentas moleculares é de extrema importância para a identificação destes moluscos vetores, uma vez que permite a distinção de espécies extremamente relacionadas, muitas das vezes indistinguíveis fenotipicamente. Além disso, fornecem dados acerca da diversidade genética, permitindo analisar níveis de polimorfismos intraespecíficos e interespecíficos. Sendo assim, estes dados podem ser utilizados em estudos filogenéticos e análises genômicas. Vale ressaltar, que a identificação molecular contribui para um diagnóstico mais preciso, e pode ser utilizada concomitantemente com a classificação morfológica.

2. JUSTIFICATIVA

O conhecimento acerca da distribuição geográfica de moluscos do gênero *Biomphalaria*, hospedeiros intermediários para o parasito trematódeo *Schistosoma mansoni*, sua ecologia e estudos para determinar a taxa de infecção natural destes moluscos, são de extrema importância para o entendimento da epidemiologia da doença. A ocorrência de esquistossomose mansônica em áreas endêmicas é determinada principalmente pela presença e abundância destes vetores parasitológicos. Sendo assim, torna-se necessário a realização de levantamentos malacológicos nas principais coleções hídricas destas áreas endêmicas para o conhecimento acerca da distribuição destes vetores.

É importante também conhecer qual espécie é o principal vetor em cada uma das áreas de ocorrência da doença, já que estratégias de controle podem ser pensadas de acordo com a ocorrência específica de determinado vetor.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

1. Realizar o levantamento malacológico no distrito de Anutiba, município de Alegre, área focal para transmissão da esquistossomose localizada na região Sul do Estado do Espírito Santo.

3.2. Objetivos específicos

1. Analisar a taxa de infecção natural dos moluscos do gênero *Biomphalaria* sp. por *S. mansoni*.
2. Realizar a classificação molecular dos espécimes pertencentes ao gênero *Biomphalaria* sp. capturados para diagnóstico específico.

7. CONCLUSÕES

O distrito de Anutiba no município de Alegre apresenta condições ideais para a manutenção do ciclo de contaminação com o parasito *Schistosoma mansoni*. A aplicação de um questionário demonstrou que a população presente no distrito de Anutiba conhece os mecanismos básicos envolvidos na transmissão da doença. Sendo assim, ressalta-se a importância em englobar o social em estratégias de prevenção e controle da doença. Além disso, a classificação molecular foi um método sensível para a identificação da espécie *Biomphalaria tenagophila*, sendo esta a espécie vetora para a esquistossomose nesta região.