

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS
UNIFAL-MG

AMANDA RIBAS GOMES

**USO DA PCR PARA MONITORAMENTO DAS ESPÉCIES DE *Biomphalaria* E
DA TAXA DE INFECÇÃO PELO *Schistosoma mansoni* EM MOLUSCOS NA
REGIÃO DO SUL DE MINAS GERAIS**

ALFENAS/MG

2014

AMANDA RIBAS GOMES

**USO DA PCR PARA MONITORAMENTO DAS ESPÉCIES DE *Biomphalaria* E
DA TAXA DE INFECÇÃO PELO *Schistosoma mansoni* EM MOLUSCOS NA
REGIÃO DO SUL DE MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências aplicadas à saúde da Universidade Federal de Alfenas, como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre.

Área de concentração: Doenças Infeciosas e Parasitárias

Orientador: Raquel Lopes Martins de Sousa

Co-orientador: Prof. Fábio Antônio Colombo

ALFENAS/MG

2014

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Gomes, Amanda Ribas.

Uso da PCR para monitoramento das espécies de *Biomphalaria* e da taxa de infecção pelo *Schistosoma mansoni* em molusco na região do Sul de Minas Gerais. / Amanda Ribas Gomes. -- Alfenas/MG, 2015.

61 f.

Orientadora: Raquel Lopes Martins Sousa.

Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) - Universidade Federal de Alfenas, 2015.

Bibliografia.

1. *Schistosoma mansoni*. 2. Esquistossomose. 3. *Biomphalaria*. 4. Reação em Cadeia da Polimerase. I. Sousa, Raquel Lopes Martins. II. Título.

CDD-616.9

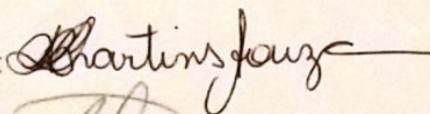
AMANDA RIBAS GOMES

USO DA PCR PARA MONITORAMENTO DAS ESPÉCIES DE *Biomphalaria*
E DA TAXA DE INFECÇÃO PELO *Schistosoma mansoni* EM MOLUSCOS
NA REGIÃO DO SUL DE MINAS GERAIS

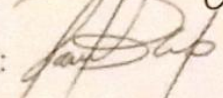
A Banca examinadora abaixo-assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências aplicadas à saúde da Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Aprovada em: 30 de janeiro de 2015

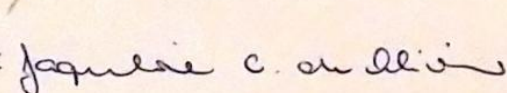
Prof^o. Dr^a Raquel Lopes Martins Sousa
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura: 

Prof^o. Dr^a Flavia Fernanda Bubula Couto
Instituição: Centro de Pesquisa René Rachou

Assinatura: 

Prof^o. Dr^a Jaqueline Carvalho de Oliveira
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura: 

Dedico aos meus pais,
mestres e amigos pelo
apoio na realização deste
trabalho.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pelo incentivo e apoio dados a mim por esses anos.

À Universidade Federal de Alfenas pelo oportunidade oferecida.

A Prof^a Dra. Raquel Lopes Martins Souza e ao Prof^o Dr. Fabio Antônio Colombo, orientadores, pela dedicação, conhecimentos transmitidos e confiança depositada na realização deste trabalho.

Ao Prof^o Dr. Marcos José Marques por estar sempre disposto a ajudar e incentivar o trabalho.

À Capes pelo apoio financeiro.

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1- Moluscos coletados nas cidades de Arceburgo, Campos Gerais e Fama- MG..... | 45 |
|---|----|

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------|--|----|
| Figura1- | Mapa da distribuição mundial da esquistossomose segundo a prevalência..... | 12 |
| Figura 2- | Distribuição brasileira de <i>Schistosoma mansoni</i> | 13 |
| Figura 3- | Formas evolutivas de <i>Schistosoma mansoni</i> | 19 |
| Figura.4- | Ciclo de vida do gênero <i>Schistosoma</i> | 22 |
| Figura 5- | Mapa de distribuição do <i>Biomphalaria glabrata</i> no território brasileiro. | 28 |
| Figura 6- | Desenho esquemático das estruturas do <i>Biomphalaria glabrata</i> | 29 |
| Figura7- | Mapa de distribuição do <i>Biomphalaria tenagophila</i> no território brasileiro..... | 30 |
| Figura 8- | Desenho esquemático das estruturas do <i>Biomphalaria tenagophila</i> | 31 |
| Figura9- | Mapa de distribuição do <i>Biomphalaria straminea</i> no território brasileiro..... | 32 |
| Figura10- | Desenho esquemático das estruturas do <i>Biomphalaria straminea</i> | 33 |
| Figura11- | Desenho esquemático demonstrando os perfis de 10 diferentes espécies e uma sub-espécie de <i>Biomphalaria</i> obtidos a partir da PCR-RFLP..... | 36 |
| Figura12- | Exame morfológico realizado nos caramujos coletados em Arcerburgo..... | 46 |
| Figura13- | Eletroforese em gel de agarose 1,5% mostrando produto de 1300 pb obtidos da amplificação do DNA dos caramujos coletados na cidade de Arceburgo como primeira etapa da PCR-RFLP..... | 47 |
| Figura 14- | Eletroforese em gel de agarose 1,5% mostrando produto de 1300 pb obtidos da amplificação do DNA dos caramujos coletados na cidade de Fama como primeira etapa da PCR-RFLP..... | 47 |
| Figura15- | Eletroforese em gel de agarose 2% mostrando os perfis que caracterizam a espécie <i>Biomphalaria tenagophila guaibenses</i> após a digestão com a enzima Ddel..... | 48 |
| Figura16- | Eletroforese em gel de agarose 2% mostrando os perfis que caracterizam a espécie <i>Biomphalaria peregrina</i> após a digestão com a enzima Ddel..... | 48 |
| Figura17- | Eletroforese em gel de agarose 2% mostrando produtos da amplificação do DNA dos caramujos provenientes de Arceburgo através da PCR para pesquisa de <i>Schistosoma mansoni</i> em caramujo..... | 49 |
| Figura 18- | Eletroforese em gel de agarose 2% mostrando produtos da amplificação do DNA dos caramujos provenientes de Fama através da PCR para pesquisa de <i>Schistosoma mansoni</i> em caramujo..... | 40 |
| Figura 19- | Mapa de uso e ocupação de solo evidenciando a cultura de café a cana de açúcar na região e pontos denotando os locais onde foram encontrados caramujos e pessoas infectadas na área de estudo..... | 54 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|----------|---|
| DNA | Ácido Desoxirribonucléico |
| ITS | Região espaçadora transcrita |
| pb | Pares de bases |
| PCR | Reação em cadeia da Polimerase |
| PCR-LS | PCR de baixa adstringência |
| PCR-RFLP | PCR de Polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição |
| qPCR | PCR em tempo real |
| rDNA | DNA ribossomal |
| WHO | World Health Organization |

RESUMO

A esquistossomose é uma doença parasitária, crônica, debilitante e em alguns casos fatal, que afeta principalmente indivíduos em áreas rurais, sendo endêmica em países tropicais e subtropicais. Por volta de 779 milhões de pessoas residem em áreas endêmicas e estão expostas ao risco de infecção. Metade dos pacientes infectados é sintomático e menos de 20 milhões apresenta manifestações severas da doença. Possui como principais transmissores os caramujos pertencentes à família Planorbidae, que, compreende o gênero *Biomphalaria*, que abriga três espécies transmissoras de *S. mansoni* no Brasil: *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria straminea*. A identificação morfológica dos moluscos de água doce de importância médica é muito complexa pela grande variação intra-específica das características morfológicas, utilizadas para a identificação clássica. Para ultrapassar este problema, tem sido proposta a utilização de técnicas de biologia molecular como ferramentas adicionais para a identificação destes moluscos. Neste contexto, a PCR tem sido bem sucedida como método específico, sensível e de rápida detecção de patógenos em uma variedade de matrizes, tais como água, solo e alimentos. Portanto, o trabalho visou utilizar a biologia molecular através da PCR para auxiliar a identificação de moluscos transmissores da esquistossomose situados nas cidades do sul de Minas Gerais e pesquisa do parasita no caramujo. Estas cidades são consideradas áreas de risco devido à presença do hospedeiro intermediário e de portadores da doença vindos de outras regiões do estado ou do país. Através da técnica de PCR foi possível evidenciar a presença dos caramujos da espécie *Biomphalaria tenagophila guaiabenses* na cidade de Arceburgo, dos quais dois deles apresentavam-se infectados, e *Biomphalaria peregrina* na cidade de Fama. A presença da infecção provavelmente deve-se a migração de indivíduos portadores da doença de áreas endêmicas para região estudada devido à oportunidade de emprego em plantações de cana-de-açúcar e café. O surgimento de novos vetores infectados leva a necessidade de um aumento no controle e vigilância da esquistossomose na região.

Palavras chave: *Schistosoma mansoni*, esquistossomose, *Biomphalaria* sp., PCR

ABSTRACT

Schistosomiasis is a parasitic disease, chronic, debilitating and lethal in some cases. It is endemic in tropical and subtropical countries and affects individuals in rural areas. Around 779 million people live in endemic areas and are at risk of infection. Fifty percent of infected patients are symptomatic and less than 20 million have severe manifestations of the disease. Its main vectors snails belong to Planorbidae family, which includes genus *Biomphalaria* and comprises three species of *Schistosoma mansoni* vectors in Brazil: *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria tenagophila* and *B. straminea*. Morphological identification of freshwater molluscs with medical importance is very complicated due the large intra-specific variations in morphological characteristics used in classical identification. In order to solve this problem, molecular biology techniques were used as additional tools for the identification of these molluscs. PCR has been successfully used as a specific, sensitive and rapid detection of pathogens in water, soil and food. Therefore, this study aimed to use PCR to confirm the identity and search for parasites in vectors of schistosomiasis in the cities of south Minas Gerais. These cities are considered risk areas due to the presence of both intermediate hosts and carriers of the disease coming from other regions of the state or country. PCR was able to demonstrate the presence of *Biomphalaria tenagophila guaibenses* snails in the city of Arceburgo, which presented two infected samples, and non-infected samples *Biomphalaria peregrina* snails in the city of Fama. The presence of infection probably occurs due to the migration of individuals, who come to work in sugarcane and coffee plantations, from endemic areas to the study area,. The occurrence of new infected vectors increases the necessity for control and surveillance of schistosomiasis in the region.

Keywords: *Schistosoma mansoni*, schistosomiasis, *Biomphalaria* sp., PCR

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 92 |
| 2 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 14 |
| 2.1 | HISTÓRICO | 14 |
| 2.2 | <i>Schistosoma mansoni</i> | 15 |
| 2.2.1 | Morfologia e formas evolutivas | 15 |
| 2.2.2 | Ciclo de vida | 18 |
| 2.3 | A DOENÇA | 20 |
| 2.3.1 | Diagnóstico | 22 |
| 2.3.2 | Tratamento | 23 |
| 2.4 | PREVALÊNCIA DE ESQUISTOSSOMOSE NO SUL DE MINAS GERAIS | 24 |
| 2.5 | MOLUSCOS TRANSMISSORES | 25 |
| 2.6.2 | PCR na detecção de <i>Schistosoma mansoni</i> em caramujos infectados | 35 |
| 3 | JUSTIFICATIVA | 37 |
| 4 | OBJETIVOS | 38 |
| 4.1 | GERAIS | 38 |
| 4.2 | ESPECÍFICOS | 38 |
| 5 | MATERIAIS E MÉTODOS | 39 |
| 5.1 | COLETA E IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DOS CARAMUJOS | 39 |
| 5.2 | EXAME DE CERCÁRIAS DE <i>Schistosoma mansoni</i> EM MOLUSCOS | 39 |
| 5.3 | EXTRAÇÃO DE DNA | 40 |
| 5.4 | AMPLIFICAÇÃO POR PCR-RFLP | 40 |
| 5.5 | DIGESTÃO E AVALIAÇÃO DOS PERFIS DO DNA AMPLIFICADO | 41 |
| 5.6 | PCR PARA PESQUISA DE <i>S. mansoni</i> | 41 |
| 6 | RESULTADOS | 43 |
| 6.1 | COLETA | 43 |
| 6.2 | IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA | 43 |
| 6.3 | PCR | 44 |
| 6.3.1 | Identificação | 44 |
| 6.3.2 | Presença de <i>S. mansoni</i> | 47 |
| 7 | DISCUSSÃO | 49 |
| 8 | CONCLUSÃO | 53 |
| | REFERÊNCIAS | 54 |

1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma doença parasitária, crônica, debilitante e em alguns casos fatal, que afeta principalmente indivíduos em áreas rurais, sendo endêmica em países tropicais e subtropicais (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011). Afeta cerca de 200 milhões de pessoas no mundo e por volta de 779 milhões de pessoas residem em áreas endêmicas e estão expostas ao risco de infecção. Calcula-se que cerca de 280 mil indivíduos morrem por ano com esta doença (ENGELS et al.; 2002; STEINMANN et al.; 2006). A esquistossomose está distribuída por 76 países e territórios, abrangendo América do Sul, Caribe, Oriente Médio, África, Sudeste Asiático e Pacífico Ocidental (CHITSULO; ENGELS; LOVERDE, 2004). A distribuição da doença está representada na figura 1 (WHO, 2011). Metade dos pacientes infectados é sintomático e menos de 20 milhões apresentam manifestações severas da doença (CHITSULO et al., 2000).

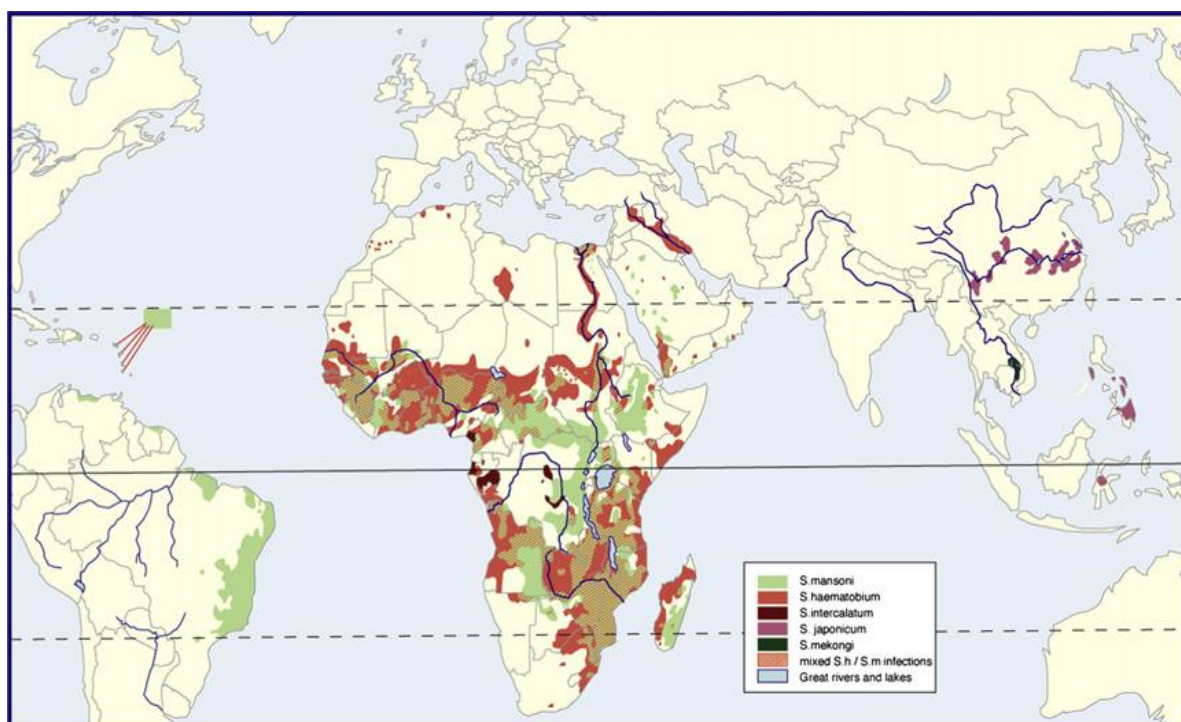


Figura 1- Mapa da distribuição mundial da esquistossomose segundo a prevalência.
Fonte: WHO (2011)

No Brasil a doença apresenta endemicidade no território do Rio Grande do Norte à Bahia, bem como no interior do Espírito Santo e Minas Gerais, como

demonstrados na figura 2 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Segundo indicadores da WHO (2011), o número de infectados chega a 6.800.000 pessoas e em áreas endêmicas, apenas 0,09% dos indivíduos que precisam de quimioterapia preventiva são tratados adequadamente. Este fato se deve, principalmente, por conta do início do tratamento com o praziquantel ou o oxaminiquine ser feito apenas com diagnóstico positivo da infecção (WHO, 2011).

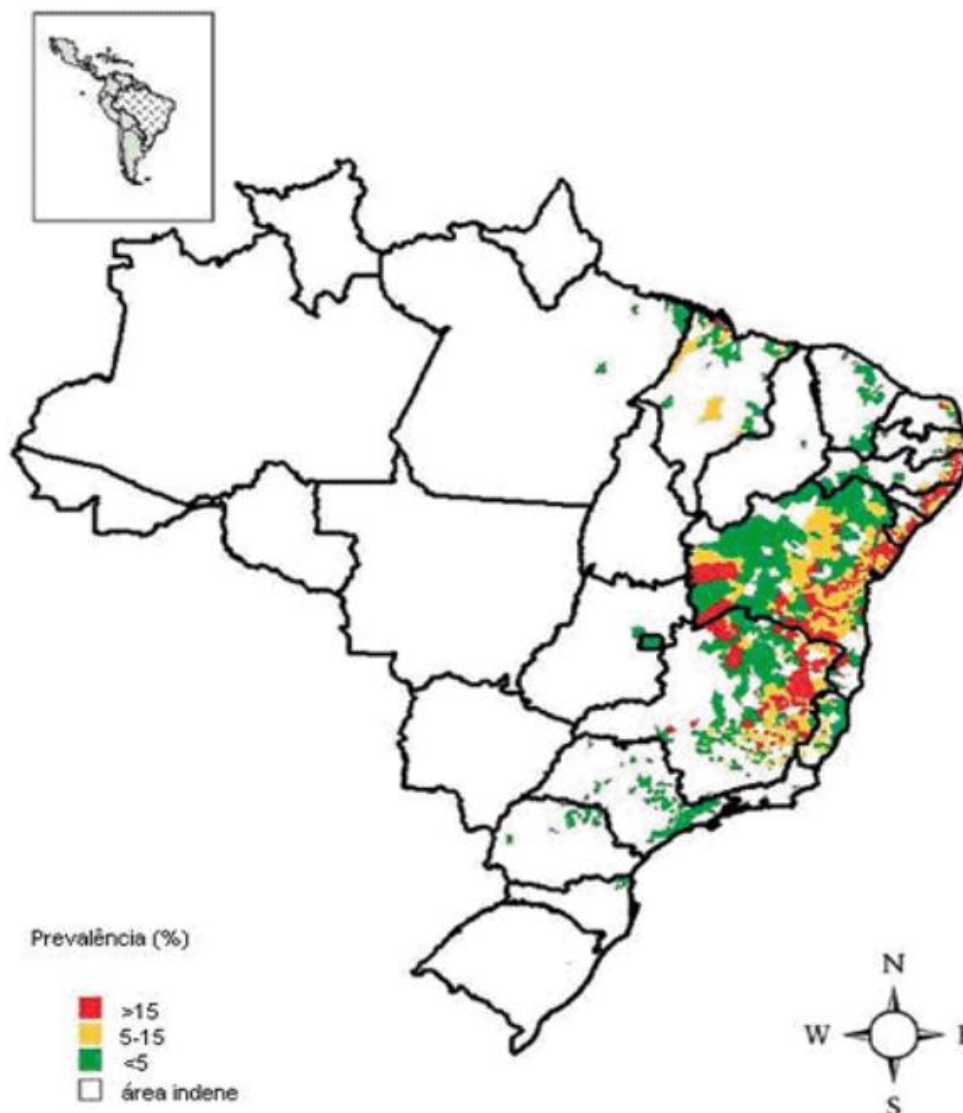


Figura 2- Distribuição brasileira de *Schistosoma mansoni*.
Fonte: Ministério da saúde (2009)

Os altos índices de morbi-mortalidade da esquistossomose mansônica no Brasil colocam em pauta de discussão as metodologias tradicionalmente empregadas no seu controle, exigindo a adoção de novas estratégias de ação. A

indicação de áreas de risco para a doença, feita a partir da análise de dados brutos em áreas heterogêneas, não possui valor estatístico nem referencial, podendo levar a interpretações não realísticas. Assim, o tratamento estatístico dos dados, sem uma análise sócio-ecológica espaçotemporal, suprime informações que podem ser cruciais para o entendimento da dispersão da doença em determinada área geográfica (BEATO-FILHO et al., 2001).

Por suas características rurais, a esquistossomose afeta principalmente as pessoas que mantem contato com coleções hídricas, em função de suas atividades profissionais (agricultura ou pesca) além das atividades de recreação e higiene pessoal (WHO, 2011). O padrão de distribuição espacial da doença indica que a dinâmica de transmissão do *Schistosoma mansoni* depende do inter-relacionamento entre o ecossistema, as pessoas e suas condições sociais (CARDIM et al., 2008). A forma de ocupação humana dos espaços urbanos das periferias das grandes cidades, aliados a alta vulnerabilidade social como desemprego, exclusão e pobreza, e a condições inadequadas de saneamento e moradia vem causando grande impacto na disseminação da esquistossomose e de várias doenças emergentes e re-emergentes no país (ANARUMA FILHO; SANTOS, 2007; MACHADO; PEIXOTO, 2005;).

Possui como principais transmissores os caramujos pertencentes à família Planorbidae, que, compreende o gênero *Biomphalaria*, que abriga três espécies transmissoras de *S. mansoni* no Brasil: *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria straminea*.

A identificação morfológica dos caramujos de água doce de importância médica, é muito complicada pela grande variação intra-específica das características morfológicas utilizados para a identificação clássica. Para ultrapassar este problema, tem sido proposta a utilização de técnicas de biologia molecular como ferramentas adicionais para a identificação destes moluscos. Para ultrapassar essas dificuldades foi então empregada a técnica de PCR-RFLP (PCR de Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição), onde a região espaçadora transcrita (ITS) foi amplificada utilizando os primers ETTS2 e ETTS1 ancorados nas regiões conservadas do genes 18S e 28S, respectivamente obtendo-se uma bando única de 1300pb e através do uso da enzima de restrição

Ddel é possível obter perfis para a identificação das espécies de *Biomphalaria* sp, (CALDEIRA; CARVALHO; JANNOTTI-PASSOS; 2009).

A detecção de caramujos infectados é comumente feita através da observação da liberação de cercárias após exposição à luz artificial ou comprimindo os caramujos entre as lâminas de vidro para detectar parasitas na glândula digestiva e outras regiões. Estes métodos não possuem eficácia para a identificação de infecções pré-patente e não permitem o diagnóstico da infecção em caramujos que morrem antes de chegar ao laboratório. Além disso, a infecção não é detectável após a migração de esporocistos para a região cefalopodal (CALDEIRA; CARVALHO; JANNOTTI-PASSOS; 2009).

Através do uso dos primers P1 e P2, utilizados anteriormente para pesquisa do *S. mansoni* em soro e fezes humanas (PONTES, 2002), é possível evidenciar a presença do parasita no caramujo mesmo no período pré-patente.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Abaixo será descrito o histórico, as formas evolutivas do parasita, a doença, seu ciclo, diagnóstico e tratamento e uma breve descrição sobre a PCR.

2.1 HISTÓRICO

As primeiras observações sobre o agente etiológico da esquistossomose foram feitas em 1851, no Egito, pelo parasitologista alemão Theodor Bilharz que em uma necropsia encontrou na veia porta um helminto e o descreveu como um helminto branco e longo encontrado em grande número no sangue da veia porta. Mais tarde observou ao microscópio o corpo achatado e a cauda encurvada e descreveu a observação da fêmea. Bilharz deu o nome ao parasito de *Distomum haematobium*. Ele considerava como bocas as duas ventosas, por isso a denominação *Distobium* (duas bocas). Após alguns anos, Weinland e Cobbold verificam que somente uma continha uma cavidade oral e, então, Weinland (1858) sugeriu *Schistosoma* (corpo fendido no macho). Em 1852, Weinland descreveu os ovos observando a espícula lateral não só em tecidos humanos como em útero de uma fêmea (CARVALHO; COELHO; LENZI, 2008).

Em 1902 Manson refere-se a um paciente inglês dizendo que banhava-se em água de fonte pública da montanha, passando através de uma aldeia e usada por toda gente. Em duas ou três ocasiões sentiu no banho um prurido. O exame microscópico revelou ovos não numerosos distribuídos por toda massa fecal com espículo lateral. Em março de 1907, perante a Zoological Society de Londres, Sambon propôs a criação de uma nova espécie parasita do homem, que denominou de *Schistosoma mansoni* (CARVALHO; COELHO; LENZI, 2008).

Pirajá da Silva, em 1908, encontrou em sangue fresco de um adolescente da Bahia o que descreveu como um hematozoário em forma crescente e um ovo muito semelhante ao do *Schistosoma mansoni*. Além dos vermes adultos ele reconheceu o estágio larval que denominou de *Cercária blanchardi*. Os estudos de Pirajá da Silva constituíram uma das contribuições mais importantes para a demonstração da especificidade do *S. mansoni* (CARVALHO; COELHO; LENZI, 2008).

Em 1964 Harley formulou a hipótese de que o miracídio penetraria em um hospedeiro intermediário, que seria um molusco, onde formaria uma bolsa de cercarias que dariam origem ao verme adulto. Trinta anos mais tarde, Looss sugeriu que o miracídio era a forma infectante para o homem, até 1914, quando Miyairi e Suzuki demonstraram a infecção em moluscos aquáticos com miracídio de *S. japonicum* (CARVALHO; COELHO; LENZI, 2008).

2.2 *Schistosoma mansoni*

A seguir serão descritos as formas evolutivas, ciclo de vida, a doença, tratamento e diagnóstico da esquistossomose.

2.2.1 Morfologia e formas evolutivas

A morfologia do *S. mansoni* deve ser estudada nas várias fases que podem ser encontradas em seu ciclo biológico: adulto - macho e fêmea - ovo, miracídio, esporocisto, cercaria e esquistossômulo (NEVES, 2011).

O macho mede cerca de 1 cm, tem cor esbranquiçada e com o corpo coberto por tubérculos. Possui ventosa oral e ventosa ventral na porção anterior e canal ginecóforo na porção posterior. Este último é o local onde a fêmea fica albergada. Em seguida à ventosa oral temos o esôfago, que se bifurca no nível do acetábulo e funde-se depois, formando um ceco único que irá terminar na extremidade posterior. Logo atrás do acetábulo encontramos de sete a nove massas testiculares que se abrem diretamente no canal ginecóforo (Figura 3A)(NEVES, 2011).

A fêmea mede cerca de 1,5 cm, tem cor mais escura devido ao ceco com sangue semidigerido, com tegumento liso. Na metade anterior, encontramos a ventosa oral e o acetábulo. Seguinte a este temos a vulva, depois o útero (com um ou dois ovos), e o ovário. A metade posterior é preenchida pelas glândulas vitelogênicas (ou vitelinas) e o ceco (Figura 3A)(NEVES, 2011).

As cercárias apresentam a seguinte morfologia: comprimento total de 500 µm, cauda bifurcada medindo 230 por 50 µm e corpo cercariano com 190 por 70

μm . Duas ventosas estão presentes. A ventosa oral apresenta as terminações das chamadas glândulas de penetração: quatro pares pré-acetabulares e quatro pares pós-acetabulares, e abertura que se conecta com o chamado intestino primitivo, primórdio do sistema digestivo. A ventosa ventral, ou acetábulo, é maior e possui musculatura mais desenvolvida (Figura 3B)(NEVES, 2011). Após a perda de sua cauda as cercárias passam então a ser chamadas de esquistossômulo (Figura 3E).

O miracídio apresenta forma cilíndrica, com dimensões médias de 180 μm de comprimento por 64 μm de largura. Apresenta, ademais, células epidérmicas, onde se implantamos cílios, os quais permitem o movimento no meio aquático. Várias estruturas internas estão contidas no meio líquido do interior da larva. A extremidade anterior apresenta uma papila apical, ou terebratorium, que pode se amoldar em forma de uma ventosa. No terebratorium encontram-se as terminações das glândulas adesivas anteriormente denominadas "glândulas de penetração" e "sacos digestivos", e as terminações da glândula de penetração anteriormente denominada "tubo digestivo primitivo" (Figura 3C)(NEVES, 2011).

O ovo mede cerca de 50 μm de comprimento por 60 de largura, sem opérculo, com um formato oval, e na parte mais larga apresenta um epísculo voltado para trás. O que caracteriza o ovo maduro é a presença de um miracídio formado, visível pela transparência da casca. O ovo maduro é a forma usualmente encontrada nas fezes (Figura 3D) (NEVES, 2011).

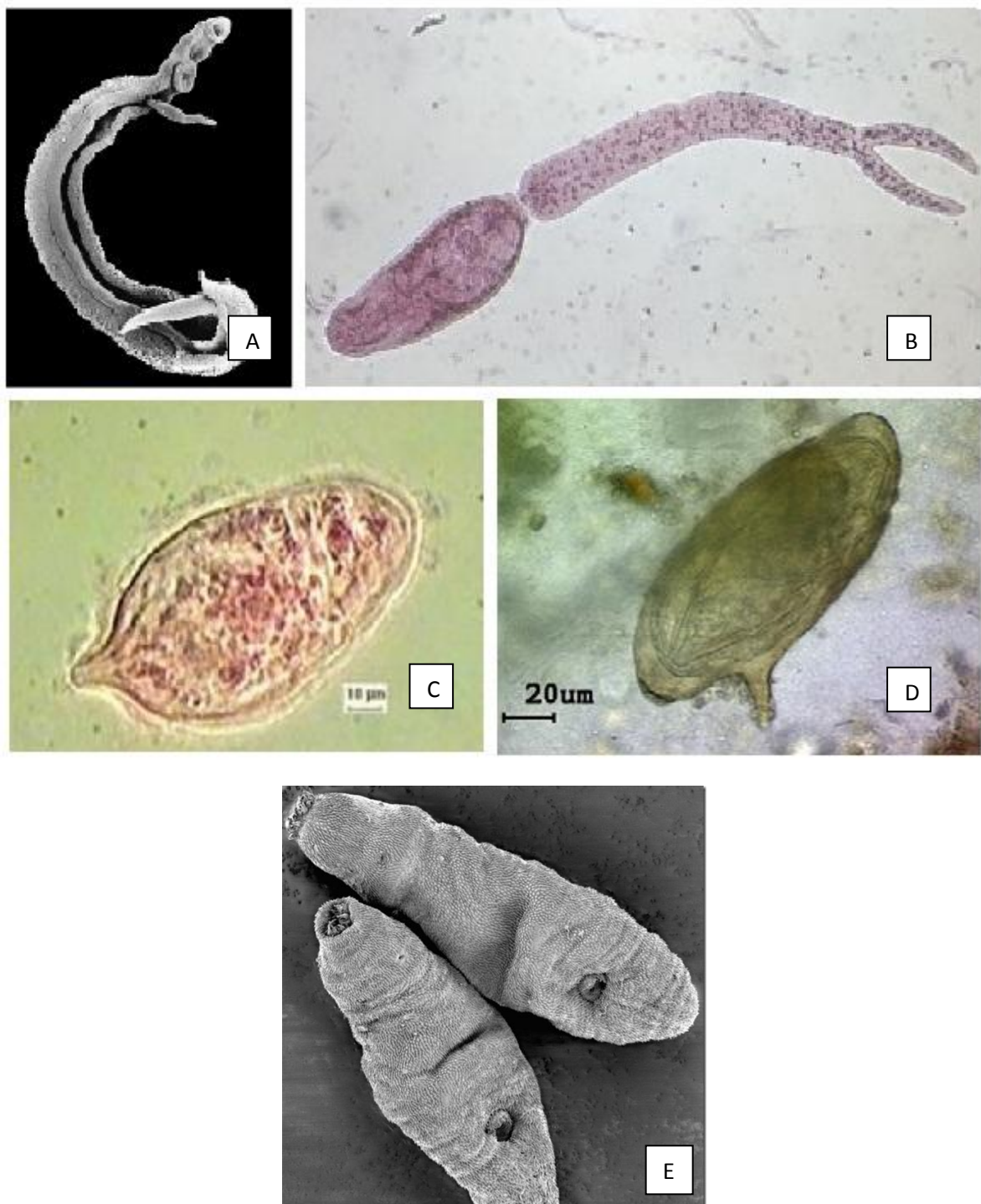


Figura 3- Formas evolutivas de *Schistosoma mansoni*

Fonte: A) Universidade do Novo México ; B) Atlas de Parasitologia/IB/UNICAMP; C)

<http://www.nhm.ac.uk>; D) Gryseels (2012), Fonte: UCSF Sandler Center

Notas: A) Macho e Fêmea de acasalados; B) Cercária; C) Miracídio; D) Ovo E) Esquistossômulo

2.2.2 Ciclo de vida

A transmissão da doença ocorre pelo contato do homem com águas onde existam moluscos infectados. O ciclo biológico de *Schistosoma mansoni* apresenta uma alternância de gerações entre o hospedeiro intermediário, moluscos do gênero *Biomphalaria* sp., e os hospedeiros definitivos, dentre eles o homem (figura 4). No ciclo de vida de *S. mansoni*, quando as fezes contaminadas de indivíduos infectados, entram em contato com a água doce e os ovos nela contido sofrem influência da baixa osmolaridade, de estímulos luminosos e da temperatura do ambiente, o que leva a intensos movimentos da larva e provoca ruptura da casca do ovo e conseqüente eclosão do miracídeo. Após a eclosão o miracídeo é atraído pela presença de moléculas do caramujo na água. O mecanismo quimiotático que leva ao encontro do miracídeo com o seu hospedeiro ainda é controverso. A infecção do caramujo do gênero *Biomphalaria* pelo *S.mansoni* se dá através da penetração ativa dos miracídeos em qualquer ponto das partes expostas do caramujo. O contato com o tegumento faz com que o terebratorium assumam forma de ventosa, ocorrendo, quase simultaneamente, a descarga do conteúdo das glândulas de adesão. O miracídeo agita-se intensamente enquanto o conteúdo da glândula é descarregado e as enzimas proteolíticas iniciam sua digestão nos tecidos. O epitélio é ultrapassado e a larva se estabelece no tecido cutâneo (CARVALHO; COELHO; LENZI, 2008; NEVES, 2011).

As células germinativas iniciam um intenso processo de multiplicação, fazendo com que, após 72 horas, a larva chamada agora de esporocisto primário dobre de tamanho. A formação do esporocisto secundário inicia-se com um alongamento de células germinativas nas paredes do esporocisto primário. Os aglomerados se organizam e dão origem a septos, que cada um destes já podem ser considerados esporocistos secundários. Estes começam então a sofrer profundas modificações anatômicas do seu conteúdo de células germinativas que formarão células embrionárias que darão origem ao esporocisto terciário. Os esporocistos secundários apresentam uma área com cercarias em desenvolvimento. A formação das cercarias, até sua emergência para o meio

aquático, pode ocorrer dentro de um período de 27 a 30 dias (CARVALHO; COELHO; LENZI, 2008).

A penetração da cercaria é antecedida por uma fase de movimentos natatórios que se iniciam após expostas a um aumento da intensidade luminosa. Os fatores que estimulam a aproximação da cercária no hospedeiro envolvem perturbações na água, toque, formação de um gradiente termal e os estímulos químicos emitidos pela pele. A adesão ao hospedeiro se dá através da região da ventosa oral que é estimulada pelo calor e por sinais de L-arginina. As cercarias então exploram a pele até encontrar o sítio adequado para penetração. Após a penetração as caudas são perdidas e de uma a três horas após, o aumento na temperatura e osmolaridade inicia uma série de adaptações bioquímicas e morfológicas que levam a cercária a transformar-se em esquistossômulo para preparar o parasito para sobreviver em novo ambiente (CARVALHO; COELHO; LENZI, 2008).

Os esquistossômulos migram para os pulmões cerca de 7 dias após a penetração e, posteriormente, para o sistema porta hepático. Após a maturação, aproximadamente 25 dias após a infecção, os vermes adultos se alojam no plexo mesentérico e vivem por vários anos, podendo viver até 20 anos, no hospedeiro definitivo (COELHO, 1970). O ciclo se completa com a postura de ovos pela fêmea, aproximadamente 300 ovos por dia (COELHO, PELLEGRINO 1978; VALADARES et al., 1981). A grande parte dos ovos é eliminada junto às fezes. Contudo, alguns ainda ficam retidos na mucosa intestinal e nos capilares do sistema porta do hospedeiro, onde desencadeiam uma reação inflamatória granulomatosa (CARVALHO; COELHO; LENZI, 2008).

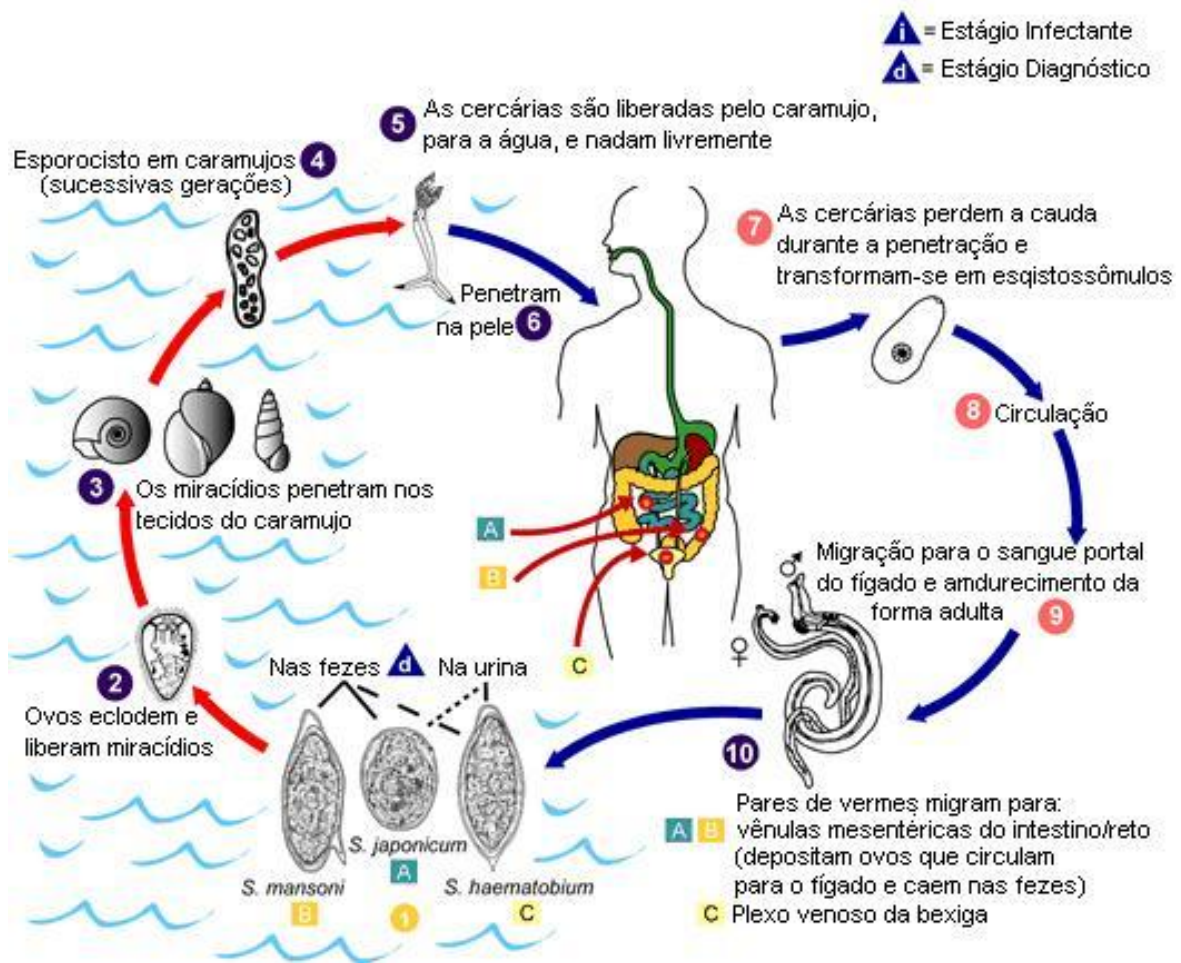


Figura.4- Ciclo de vida do gênero *Schistosoma*
Fonte: CDC

2.3 A DOENÇA

A esquistossomose se apresenta sob forma aguda e duas formas polares. Destas, uma forma é leve, geralmente assintomática chamada de hepatointestinal atingindo a maioria dos indivíduos infectados que vivem em áreas endêmicas. A outra se manifesta geralmente com hepatoesplenomegalia e outros sinais de hipertensão porta esofágicas (CARVALHO; COELHO; LENZI, 2008).

Quando a cercária penetra na pele humana, ela causa um sintoma pré-postural chamado de “dermatite cercariana”, que ocorre poucos dias a horas depois da infecção, e se caracteriza por uma pápula avermelhada e coceira local (CONLON, 2005). Uma a quatro semanas depois, a migração e maturação do

esquistossômulo pode causar uma reação de hipersensibilidade sistêmica que se caracteriza pelo aparecimento de febre (GRYSEELS, 2012). Pode ocorrer também hiper-reatividade brônquica em decorrência da migração dos esquistossômulos através dos capilares pulmonares (BARSOUM; ESMAT; EL-BAZ, 2013).

Podem ocorrer também manifestações subagudas que é uma das formas iniciais da esquistossomose estabelecendo infecção que se caracteriza por lesões inflamatórias subagudas em certos órgãos. Essas lesões são espécie e órgãos-específicas e dependem dos antígenos provocantes liberados localmente de ovos depositados ou que circulam de regurgitação sucros intestinais dos vermes adultos (BARSOUM; ESMAT; EL-BAZ, 2013).

Na forma aguda da esquistossomose temos a manifestação intestinal, que pode se caracterizar por diarreia e cólicas (CARRILHO, CHIEFFI; DA SILVA, 2005), e a hepatoesplênica, que é causada pela inflamação granulomatosa ao redor dos ovos presos no fígado e, em estágios mais avançados de fibrose resultante que pode estar agregado a estrias fibróticas longas e oclusão das veias do portal (GRYSEELS, 2012).

A forma crônica habitual ou leve (cerca de 90%) é a forma em que se encontra a maioria das pessoas nas áreas endêmicas, ou eventualmente fora delas, eliminando ovos viáveis nas fezes, mas assintomáticas ou com queixas vagas, geralmente discretas, inespecíficas. Pode-se supor que algumas manifestações intestinais podem ocorrer por conta de uma infecção de instalação recente, mas que tendem a desaparecer, com ou sem tratamento. O que se vê no fígado, e eventualmente em outros órgãos, são granulomas periovulares isolados, em várias fases de evolução para a cicatrização esofágicas (CARVALHO; COELHO; LENZI, 2008).

A forma crônica grave ou avançada da esquistossomose (de 4% a 10%) é caracterizada morfologicamente pela fibrose hepática periportal. A primeira fase de forma hepática é o resultado de uma reação imune para ovos que são aprisionados nos espaços periportal e pré-sinusoidal do fígado, produzindo uma inflamação granulomatosa local. Este processo inflamatório é a principal causa da hepatomegalia, muitas vezes associada com esplenomegalia e fortemente correlacionada com a intensidade da infecção e causas da ampliação dos espaços periportal esofágicas (CARVALHO; COELHO; LENZI, 2008). Esquistossomose

hepática fibrótica ou crônica desenvolve anos mais tarde no decurso da infecção hepática, e apenas numa pequena fração das pessoas infectadas (CLERINX; VAN GOMPEL, 2011). Em muitos outros casos a repercussão clínica se traduz nos sinais de hipertensão porta: esplenomegalia e circulação colateral esofágicas (CARVALHO; COELHO; LENZI, 2008).

A reação granulomatosa que se forma ao redor dos ovos é a principal causa da patogenia da esquistossomose. A reação granulomatosa resulta em fibrose do tecido. A fibrose dos órgãos e a obstrução do plexo venoso podem levar à hipertensão portal, hepatomegalia, esplenomegalia, ascite (aumento do volume abdominal) e formação de varizes esofágicas (CARVALHO; COELHO; LENZI, 2008).

2.3.1 Diagnóstico

O diagnóstico da esquistossomose pode ser realizado por métodos diretos e indiretos. Os métodos indiretos ou sorológicos dependem de marcadores bioquímicos e imunológicos associados à infecção, dentre os quais se destacam os testes imunológicos como a imunofluorescência, ensaios imunoenzimáticos (ELISA), reação intradérmica e reação periovular. Técnicas de reação em cadeia de polimerase estão sendo descritas para o diagnóstico da doença (DIAS-NETO; PONTES; RABELLO, 2002). Atualmente a técnica de Kato-Katz é o método parasitológico recomendado para o diagnóstico da esquistossomose, por ser quantitativo e prático (KATZ et al., 1972). No entanto, a sensibilidade desta técnica diminui quando a prevalência e intensidade da infecção são baixas (LIN et al., 2008). Os testes sorológicos para detecção de IgG e IgM no soro de pacientes, possuem uma grande sensibilidade, podendo indicar infecção atual ou passada, principalmente em áreas de baixa prevalência da doença, ou em pacientes com baixa parasitemia. O método de ELISA, por exemplo, além de proporcionar ensaios quantitativos, mostra-se mais adequado para aplicação em estudos populacionais onde se encontra baixa parasitemia, apresentando uma sensibilidade e especificidade próximas de 98% (OLIVEIRA et al., 2005). Teste de

imunofluorescência para a detecção de anticorpos contra *S. mansoni* demonstram alto grau de sensibilidade 95,6% para as fases aguda e crônica (KANAMURA et al., 2002). Entretanto, este método possui especificidade em torno de 50%. Os testes de reação em cadeia da polimerase (PCR), realizados a partir de amostras de fezes e soros de pacientes, não demonstraram reações cruzadas com outros helmintos, atingindo sensibilidade de 96,7% e especificidade de 88% (PONTES; DIAS-NETO; RABELLO, 2002). Contudo, testes como imunofluorescência e PCR não estão disponíveis na rotina do sistema público de saúde (SORGHO et al., 2005).

2.3.2 Tratamento

O único medicamento contra o verme é o Praziquantel, que tem contribuído para a diminuição da morbidade em áreas endêmicas (CHITSULO et al., 2000). O Praziquantel é menos tóxico e afeta principalmente parasitos fêmeas, causando uma alteração no seu tegumento (Redman et al., 1996) e uma redução no nível de concentração de glutathione (Ribeiro et al., 1998). Um dos possíveis alvos do Praziquantel é um canal de cálcio existente nas células da superfície do parasito, gerando um descontrole no fluxo de íons para dentro e para fora delas (CIOLI & PICA-MATTOCIA 2003), levando à morte do parasito. Apesar da disponibilidade de drogas de ação rápida, administradas em dose única por via oral, a situação da esquistossomose se apresenta bastante grave (KATZ et al., 1989). A prevalência da doença permanece inalterada em muitas regiões endêmicas, devido, na maioria dos casos, aos altos níveis de reinfecção de indivíduos já tratados, seguido do possível aparecimento de populações de parasitos naturalmente resistentes ao tratamento (BENNETT et al., 1997). O desenvolvimento de uma vacina contra o parasito seria de grande importância no controle da endemia.

2.4 PREVALÊNCIA DE ESQUISTOSSOMOSE NO SUL DE MINAS GERAIS

A expansão territorial da esquistossomose está muito relacionada aos movimentos populacionais, ou seja, ao deslocamento de pessoas de áreas endêmicas para áreas que apesar de não terem a doença, não tem saneamento básico, o principal fator de contaminação, e tem a presença do molusco hospedeiro. É neste contexto que a região do Sul de Minas merece atenção.

As regiões sul e sudoeste de Minas são compostas de aproximadamente 156 municípios, a grande maioria pequenas cidades e uma área considerável inundada pelo Lago de Furnas. A economia da mesorregião do Sudoeste de Minas se baseia em atividades voltadas para a agricultura e pecuária, sendo assim as empresas agropecuárias importam de mão de obras de outras regiões do Estado e do País. Estudo realizado por Siqueira e colaboradores, demonstrou que os casos positivos notificados pela Gerência Regional de Saúde de Alfenas, eram casos importados, sendo os indivíduos parasitados, trabalhadores rurais que eram recrutados pelas empresas agropecuárias da região. As constantes correntes migratórias de trabalhadores vindos de áreas endêmicas para a esquistossomose, e o estabelecimento destes em bairros de periferia das cidades, que muitas vezes não possuem condições sanitárias adequadas, associados ainda ao grande número de coleções hídricas da região, caracterizam um quadro que merece atenção especial no que diz respeito ao controle da esquistossomose.

Associado a estes fatores, a presença do molusco transmissor, caramujos do gênero *Biomphalaria* já foi encontrado na região. Souza e colaboradores descrevem as espécies de *Biomphalaria* já encontradas no Estado de Minas Gerais e destaca-se a região mesoregião Sudoeste onde as espécies *B. glabrata*, *B. tenagophila*, *B. straminea*, *B. peregrina*, *B. schrammi* e *B. occidentalis* foram encontradas. Este relato das espécies nesta região foi realizada, na maioria, na década de 80, fazendo-se necessário um levantamento malacológico atual da região. Em Alfenas Siqueira e colaboradores em 1988, identificaram as espécies, *B. tenagophila* e *B. peregrina*. E a primeira espécie, *B. tenagophila*, infectada pelo *S. mansoni*, foi identificada por Carvalho e colaboradores em Itajubá e o foco de transmissão confirmado mais tarde por Guimarães e colaboradores em 1993.

2.5 MOLUSCOS TRANSMISSORES

No Brasil, temos dez espécies de moluscos do gênero *Biomphalaria*, mas somente três foram encontradas eliminando cercárias de *S. mansoni* em ambientes aquáticos naturais que são: *Biomphalaria glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*. Duas outras espécies, *B. amazônica* e *B. peregrina* podem ser infectadas com *S. mansoni* em condições experimentais (BRASIL, 2008).

Os moluscos do gênero *Biomphalaria* apresentam concha discoidal, variando de 7 a 40 mm de diâmetro; apresentam hemolinfa pigmentada devido à presença de hemoglobina e tubo renal em forma de J.

Biomphalaria glabrata é o mais importante transmissor de *S. mansoni* na região neotropical, não só pelo alto grau de susceptibilidade de suas populações ao parasito como pela extensão de sua distribuição geográfica. De fato, *B. glabrata* já foi notificada em 16 estados brasileiros, além de no Distrito Federal, e em 806 municípios de uma área delimitada pelos paralelos 0° 53'S (Quatipuru, PA), 29° 51'S (Esteio, RS), 53° 44'S (Toledo, PR) e a linha costeira (figura 5) (Brasil, 2008). A espécie *B. glabrata* se caracteriza por apresentar concha com até 40 mm de diâmetro e 11 mm de largura, seis a sete giros arredondados. Apesar da descrição característica da concha da espécie, alguns exemplares podem apresentar morfologia que foge à referida descrição, o que leva a concha não ser um parâmetro ideal para a identificação da espécie. Por outro lado, a *B. glabrata* apresenta características internas típicas que são utilizadas para a sua identificação. Dentre estas se destaca a presença de crista renal pigmentada ao longo da superfície ventral do tubo renal em indivíduos adultos e a linha pigmentada em indivíduos jovens. Tal característica não pode ser vista em nenhuma outra espécie deste gênero. Além da crista renal pigmentada, a *B. glabrata* apresenta ovoteste com mais de 350 divertículos; presença de bolsa vaginal; porção média da bainha do pênis aproximadamente do mesmo diâmetro que a porção mais larga do canal deferente (figura 6).

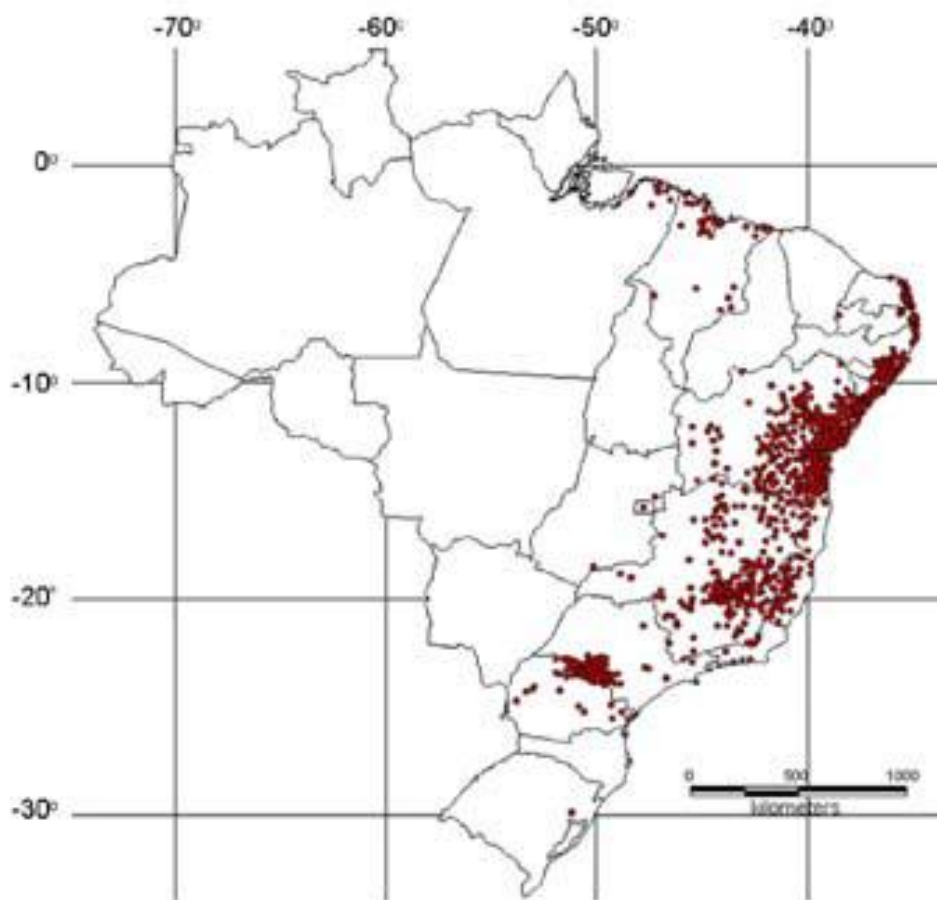


Figura 5- Mapa de distribuição do *Biomphalaria glabrata* no território brasileiro.
Fonte: Carvalho e Caldeira (2004)

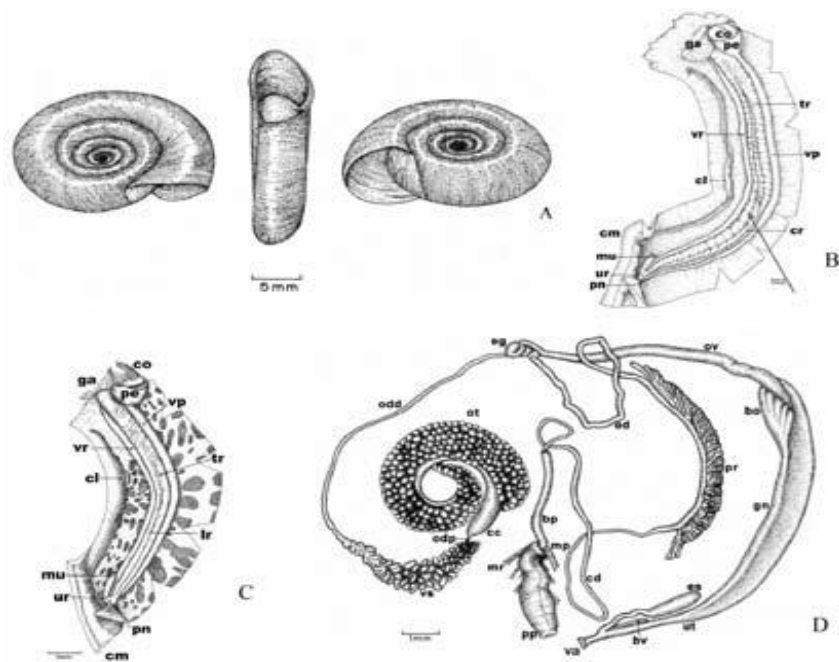


Figura 6- Desenho esquemático das estruturas do *Biomphalaria glabrata*

Fonte: Brasil (2008)

Nota: A) Concha de *B. glabrata*: vista do lado direito, vista frontal e vista do lado esquerdo, respectivamente; B) manto de um exemplar adulto, onde se vê a crista renal; C) manto de um exemplar jovem com linha renal pigmentada; D) sistema reprodutor.

Biomphalaria tenagophila é encontrada desde a Argentina (Patagônia) até o sul do Estado da Bahia. Foi notificada em 603 municípios de 10 estados brasileiros, além de no Distrito Federal, em um quadrante delimitado pelos paralelos 10° 12' e 33° 41' S, pelo meridiano 57°05' W e a linha litorânea (figura 7)(Brasil, 2008). Esta espécie vem apresentando crescente importância epidemiológica na transmissão da esquistossomose, devido à descoberta de novos focos mantidos por ela no país, principalmente nas regiões Sul e Sudeste. O *Biomphalaria tenagophila* foi descrita por Orbigny (1835) com base em exemplares coletados em Corrientes (Argentina) e em Santa Cruz e Chiquitos (Bolívia). Apresenta concha 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. A presença da carena normalmente só é vista nesta espécie, porém podem ser encontrados indivíduos *B. glabrata* mais largos e com esta característica, ou mesmo *B. tenagophila* em que esta está ausente. Sendo assim estas espécies podem ser confundidas se forem levadas em conta apenas as características das conchas. Em relação à anatomia interna da *B. tenagophila*, esta espécie difere de

B. glabrata pela ausência de linha ou crista renal pigmentada e presença de ovoteste com mais de 150 e menos de 350 divertículos (figura 8)

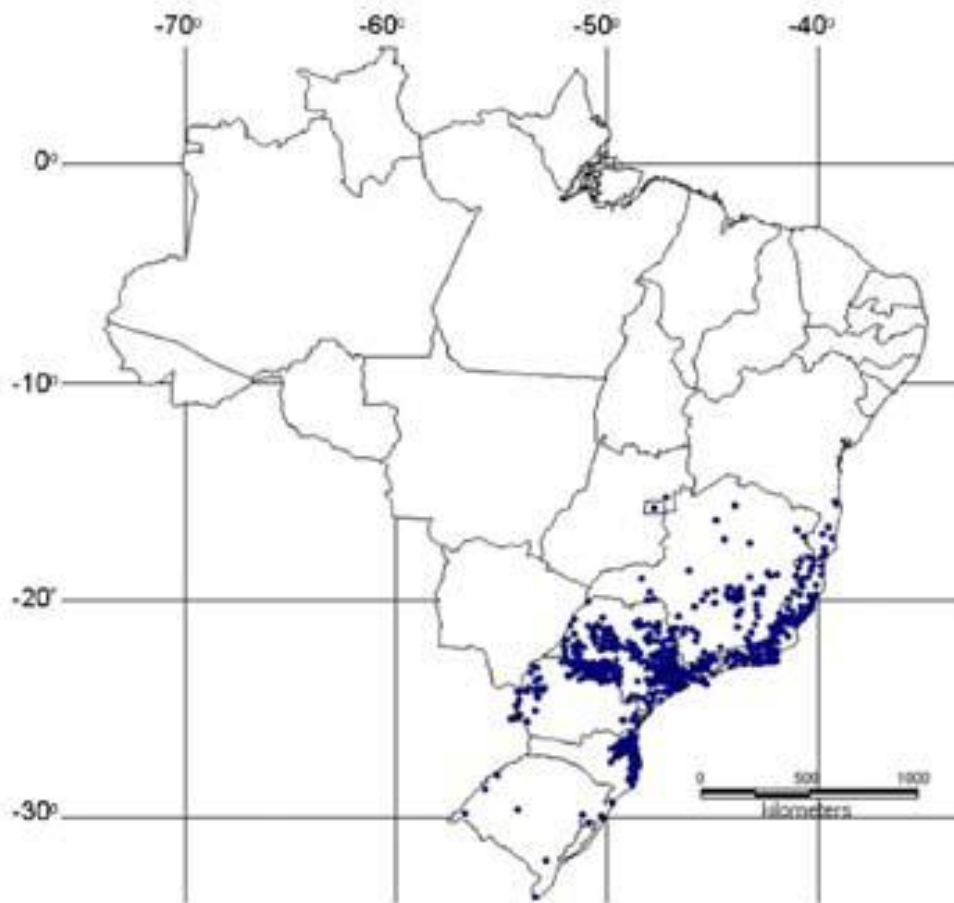


Figura 7- Mapa de distribuição do *Biomphalaria tenagophila* no território brasileiro.
Fonte: Carvalho e Caldeira (2004)

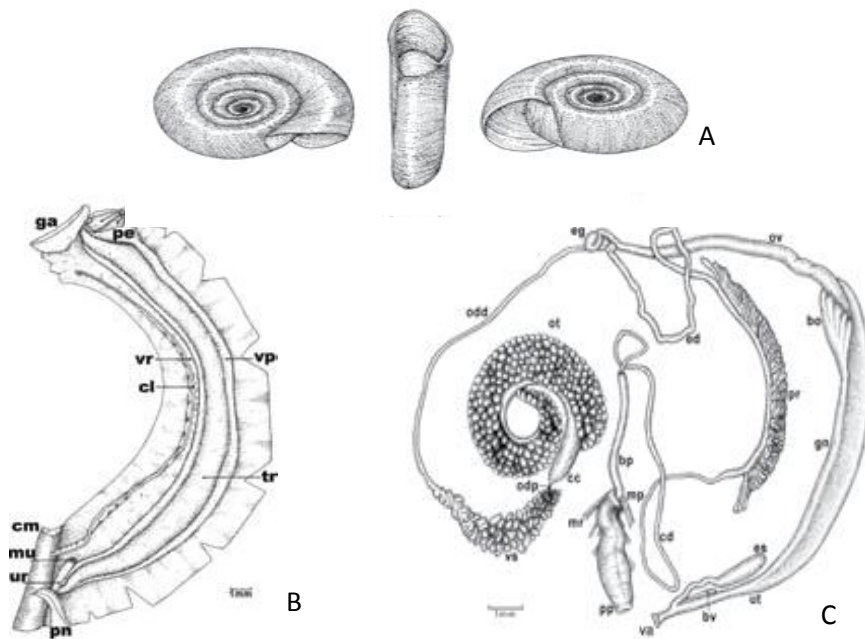


Figura 8- Desenho esquemático das estruturas do *Biomphalaria tenagophila*

Fonte: Brasil (2008)

Nota: A) Concha de *B. tenagophila*: vista do lado direito, vista frontal e vista do lado esquerdo, respectivamente; B) manto mostrando o tubo renal liso; C) sistema reprodutor.

A presença de *Biomphalaria straminea* foi registrada em 1.327 municípios, distribuídos por 24 estados brasileiros, além de no Distrito Federal. Esta espécie apresenta uma densidade populacional alta no Nordeste brasileiro e por isso é a responsável pela transmissão de *S. mansoni* em várias áreas do Nordeste brasileiro, sendo a única hospedeira do *S. mansoni* no Estado do Ceará (figura 9) (Brasil 2008). O *Biomphalaria straminea*, apresenta concha com até 16,5 mm de diâmetro e 6 mm de largura; cinco giros arredondados. Internamente, *B. straminea* apresenta um enrugamento na parede dorsal da vagina, o que lhe diferencia de *B. glabrata* e *B. tenagophila* (figura 10).



Figura 9- Mapa de distribuição do *Biomphalaria straminea* no território brasileiro.
Fonte: Carvalho e Caldeira (2004)

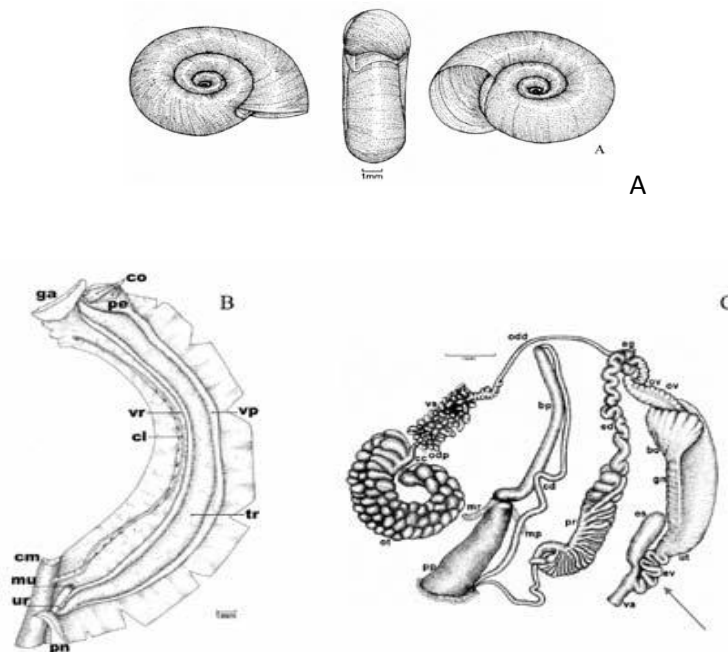


Figura 10- Desenho esquemático das estruturas do *Biomphalaria straminea*
 Fonte: Brasil (2008)

Nota: A) Concha de *B. straminea*: vista do lado direito, vista frontal e vista do lado esquerdo, respectivamente; B) manto, onde se vê o tubo renal liso; C) sistema reprodutor evidenciando o enrugamento vaginal.

Apesar das características morfológicas marcantes, a diferenciação das três espécies tem sido realizada através da biologia molecular, pois podem ocorrer variações entre as espécies.

A identificação morfológica dos moluscos é realizada através de características das conchas e do tubo renal e anatomia dos órgãos reprodutivos (PARAENSE,1975).

2.6 PCR

A PCR foi concebida pelo Químico Americano Kary Mullis em 1983. Mullis desenvolveu um processo através do qual o DNA poderia ser multiplicado artificialmente através de ciclos repetidos de temperatura cuja reação seria catalisada pela DNA polimerase. É uma técnica que se baseia na polimerização de DNA em cadeia realizada *in vitro*, que se denomina de PCR, Polymerase Chain Reaction – Reação em Cadeia da Polimerase, e que consiste em um método de

amplificação, isto é, criação de múltiplas cópias de DNA, por replicação enzimática, sem necessitar de um organismo vivo. A reação utiliza dois oligonucleotídeos iniciadores que hibridizam com cadeias opostas e flanqueiam a sequência de DNA a amplificar (MIGUEL, 2007). No fim de um ciclo de PCR obtém-se duas novas cadeias de DNA para cada alvo da dupla cadeia. Assim, duas novas cadeias são sintetizadas a partir da cadeia molde em cada ciclo completo da técnica de PCR, fazendo com que se dê um crescimento exponencial, havendo ao fim de n ciclos 2^n vezes mais cópias do que havia no início (DELIDOW et al., 1993).

A PCR em tempo real, também conhecida como PCR quantitativa ou PCR em tempo real quantitativa ou simplesmente qPCR, foi descrita pela primeira vez em 1993, por Higuchi e seus colaboradores. Montaram um sistema ao qual acoplaram uma câmara de vídeo, de modo a monitorizar a PCR durante todos os ciclos. Este mecanismo permitia-lhes detectar o aumento da fluorescência durante a reação, devido à ligação do brometo de etídio às moléculas de DNA de dupla cadeia recém-sintetizadas (HIGUCHI et al., 1993). O procedimento é semelhante ao da técnica da PCR convencional diferindo essencialmente numa característica inovadora: a possibilidade de quantificação em tempo real do DNA amplificado, em cada ciclo de amplificação. Neste método, as fases de amplificação, detecção e quantificação são totalmente automatizadas, ocorrendo em simultâneo e em tempo real (HEID et al., 1996). Os compostos fluorescentes adicionados ao DNA geram um sinal de fluorescência que é diretamente proporcional à quantidade de produto amplificado ao longo das diferentes fases. A fase de crescimento exponencial é considerada a melhor para se estudar a reação devido à elevada eficiência registrada, uma vez que a relação entre a quantidade de produto e do input de DNA é mais consistente. Por este motivo os dados de fluorescência são geralmente recolhidos desde o início do processo de amplificação (KUBISTA et al., 2006).

2.6.1 PCR na identificação de moluscos transmissores da esquistossomose

A identificação morfológica dos caramujos de água doce de importância médica, é muito complicada pela grande variação intra-específica das características morfológicas utilizados para a identificação clássica. Para ultrapassar este problema, tem sido proposta a utilização de técnicas de biologia molecular como ferramentas adicionais para a identificação destes moluscos. Em estudos anteriores, testou uma técnica de baixa adstringência da reação em cadeia da polimerase (PCR-LS) que permitiu a diferenciação de *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*, no entanto, *B. straminea* mostrou perfis diferentes entre as populações (VIDIGAL, 1996). Mais tarde a PCR-LS seria utilizada para identificar *B. tenagophila* e *B. occidentalis*, mas os perfis gerados eram muito complexos, além da presença de outros perfis o que dificultava a identificação (CALDEIRA; JANNOTTI-PASSOS; CARVALHO, 2009).

Para ultrapassar essas dificuldades da PCR-LS foi então empregada a técnica de PCR-RFLP (PCR de Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição), onde a região espaçadora transcrita (ITS) foi amplificada utilizando os primers ETTS2 e ETTS1 ancorados nas regiões conservadas do genes 18S e 28S, respectivamente obtendo-se uma bando única de 1300pb e através do uso da enzima de restrição Ddel é possível obter perfis para a identificação das espécies de *Biomphalaria* sp, como observado na figura 11 (CALDEIRA; JANNOTTI-PASSOS; CARVALHO, 2009).

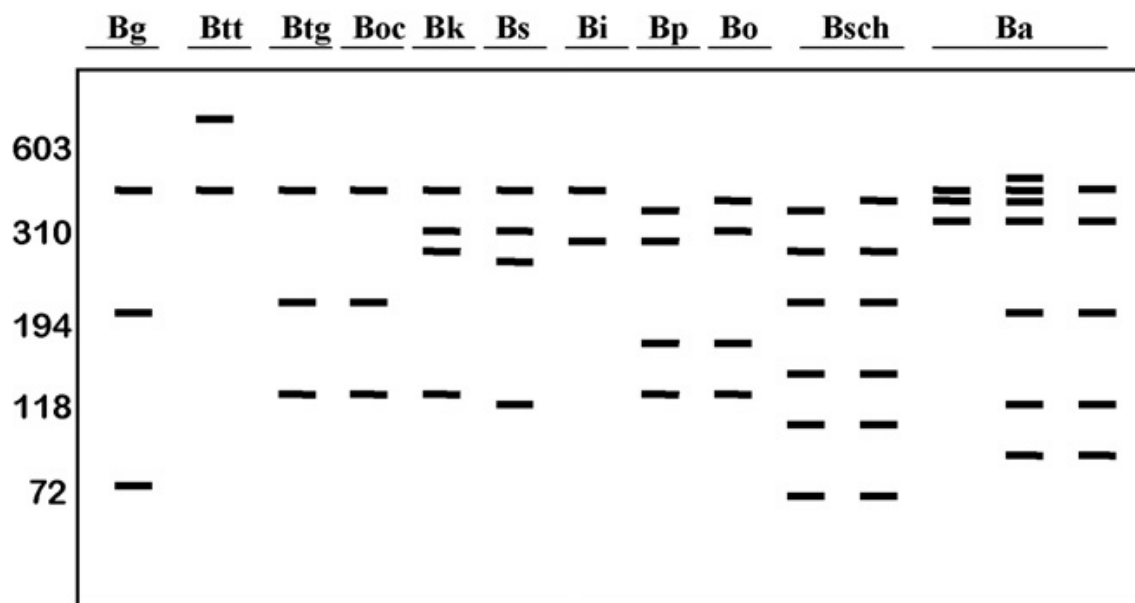


Figura 11- Desenho esquemático demonstrando os perfis de 10 diferentes espécies e uma sub-espécie de *Biomphalaria* obtidos a partir da PCR-RFLP

Fonte: Vidigal (2000)

Nota: Bg, *Biomphalaria glabrata*; Btt, *Biomphalaria tenagophila*; Btg, *Biomphalaria tenagophila guaibenses*; Boc, *Biomphalaria occidentalis*; Bk, *Biomphalaria kuhniana*; Bs, *Biomphalaria straminea*; Bi, *Biomphalaria intermédia*; Bp, *Biomphalaria peregrina*; Bo, *Biomphalaria oligoza*; Bsch, *Biomphalaria schrammi*; Ba, *Biomphalaria amazônica*.

Em trabalhos de campo, é comum se encontrar apenas a concha dos moluscos do gênero *Biomphalaria* sem o corpo, o que impossibilita a identificação e a detecção do *S. mansoni*. Além disso, encontram-se depositadas em coleções malacológicas diversas conchas que apresentam classificação duvidosa ou imprecisa. Para solucionar essas questões, foi desenvolvida uma estratégia para extração de vestígios do corpo do molusco existentes no interior de conchas vazias. As conchas utilizadas estavam depositadas na coleção do Centro de Pesquisas René Rachou desde 1992. Utilizou-se como padrão de comparação o DNA extraído das respectivas partes moles desses moluscos, armazenados a -20°C desde 1992. O DNA obtido da concha e do padrão de comparação foi submetido à técnica PCR-RFLP direcionada para a região ITS2 do rDNA com a enzima HpaI. Dessa forma, pode-se observar os perfis específicos de *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea* (CALDEIRA; JANNOTTI-PASSOS; CARVALHO, 2009).

2.6.2 PCR na detecção de *Schistosoma mansoni* em caramujos infectados

A detecção de caramujos infectados é comumente feita através da observação da liberação de cercárias após exposição à luz artificial ou comprimindo os caramujos entre as lâminas de vidro para detectar parasitas na glândula digestiva e outras regiões. Estes métodos não possuem eficácia para a identificação de infecções pré-patente e não permitem o diagnóstico da infecção em caramujos que morrem antes de chegar ao laboratório. Além disso, a infecção não é detectável após a migração de esporocistos para a região cefalopodal (CALDEIRA; JANNOTTI-PASSOS; CARVALHO, 2009).

Em 1991, Hamburguer e colaboradores realizaram um estudo no qual utilizou sondas para a caracterização de uma região altamente repetitiva do DNA genômico do *Schistosoma mansoni*, e demonstrou a alta sensibilidade para detecção do parasita no caramujo. Mais tarde, o mesmo grupo desenvolveu uma PCR para o monitoramento de coleções hídricas, utilizando os primers P1 (5'-GAT CTG AAT CCG ACC AAC CG) e P2 (5'-ATA TTA ACG CCC ACG CTC TC), no qual tem como alvo uma região repetida em tandem do DNA genômico, a mesma região utilizada no estudo anterior, do *Schistosoma mansoni* obtendo-se um produto de 121pb (HAMBUGUER, et al, 1998). O mesmo primer também foi utilizado e um estudo no qual utilizava a PCR para a detecção do DNA do parasita em soro e fezes humanas (PONTES, 2002)

Outra técnica de biologia molecular, denominada Multiplex-PCR, que utiliza simultaneamente mais de um par de iniciadores, foi utilizada na identificação de espécies de *Biomphalaria* e no diagnóstico de infecção pelo *S. mansoni*. Para a identificação das espécies dos moluscos, foram utilizados iniciadores ancorados na região do ITS2 do rDNA. Já para a detecção do *S. mansoni*, foram utilizados iniciadores ancorados no DNA mitocondrial de *S. mansoni*. O uso simultâneo desses iniciadores permitiu a identificação de *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea* pela observação dos fragmentos correspondentes a cada espécie (um fragmento de 280pb para *B. glabrata*, um de 320pb para *B. tenagophila* e outro de 350pb para *B. straminea*); a detecção da presença de *S. mansoni* e o diagnóstico de *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea* com 7, 14 e 28 dias de infecção; e a

identificação de *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea* negativos para o *S. mansoni* (JANNOTTI-PASSOS et al., 2006).

3 JUSTIFICATIVA

Pelo fato de a identificação morfológica dos caramujos do gênero *Biomphalaria* ser muito complicada devido a grande variação intra-específica das características morfológicas, e de o método convencional para estimação da infecção necessitar de pelo menos um mês para iniciar a liberação das cercarias, faz-se necessário o uso de técnicas moleculares para uma identificação mais específica do hospedeiro intermediário do *S. mansoni*, além de que a PCR é capaz de detectar algumas subespécies de grande importância na transmissão da doença, o que não é possível através da morfologia. O fluxo de pessoas infectadas pelo parasita na região de estudo, devido a cultura de café e de cana de açúcar torna necessário um estudo de vigilância no local estudado. Com este projeto será possível identificar especificamente os caramujos e o *S. mansoni* nestes hospedeiros. O trabalho poderá contribuir com a profilaxia da esquistossomose no sul de Minas Gerais, uma vez que irá identificar as possíveis áreas de risco de transmissão da esquistossomose.

4 OBJETIVOS

Abaixo serão listados os objetivos gerais e específicos

4.1 GERAIS

Utilizar a reação em cadeia da polimerase para identificar o hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni* e estimar a infecção dos caramujos provenientes das possíveis áreas de risco.

4.2 ESPECÍFICOS

Segue abaixo os objetivos específicos:

- a) Coletar os caramujos de coleções hídricas áreas com possível risco para a transmissão de esquistossomose;
- b) Realizar reações de PCR para identificação específica dos caramujos e detecção do *S. mansoni* no caramujo;
- c) Usar os iniciadores ETTS1 e ETTS2 para amplificação de DNA dos caramujos do gênero *Biomphalaria* sp. e a técnica de restrição enzimática com a enzima *Ddel* nos produtos obtidos pelos iniciadores para a identificação das espécies;
- d) Identificar a espécie *S. mansoni* no DNA extraído do caramujo usando os iniciadores P1 e P2.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram realizadas três etapas pra a execução do trabalho: i) coleta dos caramujos nos municípios de Arceburgo, Campos Gerais e Fama, ii) Identificação morfológica e pesquisa de cercária pelos métodos convencionais, iii) confirmação do morfológico e da pesquisa de cercária através da PCR.

5.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DOS CARAMUJOS

Os caramujos utilizados no trabalho foram coletados na Bacia Hidrográfica de cidades da região sul do estado de Minas Gerais onde foram notificados casos humanos de infecção por *S. mansoni*, nas cidades de Arceburgo, Fama e Campos Gerais, onde foi feita uma coleta em cada cidade, seguindo a técnica de coleta que consiste em raspar com a concha de captura a vegetação submersa, as margens e o fundo dos criadouros. Na superfície, o material recolhido deve ser cuidadosamente analisado à procura dos moluscos, observando-se as folhas e os pequenos gravetos, onde os espécimes jovens ou pequenos moluscos encontram-se presos. À medida que os moluscos vão sendo encontrados, devem ser postos no recipiente plástico, sem água, e o material da concha deve ser novamente lavado até a confirmação da ausência de moluscos, para então ser desprezado.

A identificação morfológica dos moluscos foi realizada através da observação das características das conchas, do tubo renal e anatomia dos órgãos reprodutivos.

5.2 EXAME DE CERCÁRIAS DE *Schistosoma mansoni* EM MOLUSCOS

Para a pesquisa de cercárias, os caramujos foram isolados em frascos de vidro transparente (com capacidade de 10ml), com 4ml de água desclorada e

filtrada, e expostos à luz de lâmpadas incandescentes (de 60W) a uma distância de 30cm, durante 2 horas. Tal procedimento fornece uma temperatura entre 28°C e 30°C, capaz de estimular a eliminação cercariana. Decorridas as 2 horas os moluscos são observados em lupa para evidenciar a possível presença de cercarias.

5.3 EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA total foi extraído a partir dos pés dos caramujos. Os tecidos foram digeridos em 400 µl de tampão de lise nucleico deixando-os a temperatura de 37°C por 24h. Em seguida, foram adicionados 200 µl de fenol e a amostra foi centrifugada a 8.000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um tubo onde adicionou-se 200 µl de clorofórmio-isopropanol gelado e centrifugado a 8.000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, onde foi adicionado isopropanol gelado 3x o volume e foi feita a homogeneização para precipitação do DNA e a centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante é desprezado e o sedimento contendo o material genético foi ressuspenso com 200 µl de etanol a 70% e centrifugado durante 1 minuto. Desprezou-se o etanol com cuidado e a amostra secou a temperatura ambiente. Para a reidratação foi adicionado 50 µl de água para biologia molecular.

5.4 AMPLIFICAÇÃO POR PCR-RFLP

A região ITS foi toda amplificada utilizando os primers ETTS2 (5'-TAA CAA GGT TTC CGT AGG TGA A-3') e ETTS1 (5'-TGC TTA AGT TCA GCG GGT-3') ancorada respectivamente nas extremidades conservadas dos genes ribossomais 18S e 28s. A amplificação por PCR foi realizada num volume de 11 µl que consiste em um mix com 8,5 µl de Blue mix, 0,25 µl de cada primer, 2 µl de DNA. As reações foram submetidas ao seguinte programa de ciclo: passo de desnaturação

inicial durante 3 min a 95 ° C e, em seguida 32 ciclos com anelamento a 54 ° C durante 1 min, extensão a 72 ° C durante 2 min de desnaturação a 95 ° C durante 45 segundos e um passo de extensão final a 72°C durante 5 min. Um controle negativo (sem DNA) foi incluído em todas as experiências. Três microlitros dos produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio para verificar a amplificação.

5.5 DIGESTÃO E AVALIAÇÃO DOS PERFIS DO DNA AMPLIFICADO

A digestão do DNA amplificado foi feita para a diferenciação das espécies do caramujo do gênero *Biomphalaria* sp. O produto amplificado foi diluído para obter um volume final de 30µl, deste será retirado 10µl e transferido para um tubo onde adicionou-se 1µl do tampão e 0,3µl da enzima Ddel. A digestão foi realizada a 37°C por 3,5 horas. O produto da digestão foi visualizado em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio. Os resultados obtidos foram comparados com um padrão (Figura 11) para obter as espécies.

5.6 PCR PARA PESQUISA DE *S. mansoni*

Através do uso dos primers P1 (5'-GAT CTG AAT CCG ACC AAC CG) e P2 (5'-ATA TTA ACG CCC ACG CTC TC) amplificou-se uma região repetida em tandem do DNA de *S. mansoni*. A amplificação por PCR foi realizada num volume de 12 µl em um mix que consiste em 3,25 µl de água, 6,25 µl de green mix, 0,25 µl de cada primer e 2 µl de DNA. As reações foram submetidas ao seguinte programa de ciclo: passo de desnaturação inicial durante 3 min a 95 ° C e, em seguida 32 ciclos com anelamento a 60 ° C durante 1 min, extensão a 72 ° C durante 2 min de desnaturação a 95 ° C durante 45 segundos e um passo de extensão final a 72°C durante 5 min. Foi incluído um controle negativo (sem DNA) e um controle positivo com amostra de verme adulto de *S. mansoni*. 10 µl dos produtos de amplificação

foram visualizados em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio para verificar a amplificação.

6 RESULTADOS

Segue abaixo os resultados obtidos no trabalho

6.1 COLETA

Foram encontrados moluscos do gênero *Biomphalaria* sp nas cidades de Arceburgo em três pontos diferentes do município e em Fama em apenas um ponto. Foi possível também capturar um caramujo do gênero *Lymnea* sp, um do *Physa* sp, três do *Melanoides* sp e dois do *Achatina* sp. Na cidade de Campos Gerais foram encontrados apenas moluscos do gênero *Melanoides* sp. em um total de três espécimes (Tabela 1).

Tabela 1: Moluscos coletados nas cidades de Arceburgo, Campos Gerais e Fama-MG

| Cidades | Moluscos coletados | | | | |
|---------------|--------------------|----------|----------|----------|----------|
| | Bm | Ac | Mn | Ly | Ph |
| Arceburgo | 35 | 2 | 3 | 1 | 1 |
| Campos Gerais | - | - | 4 | - | - |
| Fama | 40 | - | - | - | - |
| Total | 75 | 2 | 7 | 1 | 1 |

Nota: *Bm – *Biomphalaria* sp.

Ac – *Achatina* sp.

Mn – *Melanoides* sp.

Ly – *Lymnea* sp.

Ph – *Physa* sp.

Fonte: Da autora

6.2 IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA

No total de trinta e cinco caramujos do gênero *Biomphalaria* sp coletados em Arceburgo apenas onze estavam viáveis para identificação morfológica, destes, todos foram identificados como *Biomphalaria tenagophila*. Abaixo podemos observar as imagens do exame morfológico (figura 12). Não foi possível realizar o morfológico nos caramujos coletados em Fama pois seu tamanho era reduzido, o que dificultava a visualização de seus órgãos internos.



Figura -12: Exame morfológico realizado nos caramujos coletados em Arcerburgo

Fonte: Da autora

Notas: A) Manto de *Biomphalaria tenagophila* com ausência de pigmentação no tubo renal; B) Estrutura masculina do órgão reprodutor; C) Estrutura feminina do órgão reprodutor apresentando bolsa vaginal bem definida, ausência de enrugamento vaginal.

6.3 PCR

Segue abaixo os resultados obtidos com a PCR

6.3.1 Identificação

Os produtos de 1300 pb da amplificação para identificação das espécies de *Biomphalaria* foram obtidos em trinta e cinco das setenta e cinco amostras (figura

13 e 14). Após a digestão com a enzima Ddel obteve-se os perfis a partir do qual foi possível identificar os moluscos capturados em Arceburgo como da espécie *Biomphalaria tenagophila guaibeinses* e os de Fama como *Biomphalaria peregrina* (figura 15 e 16).

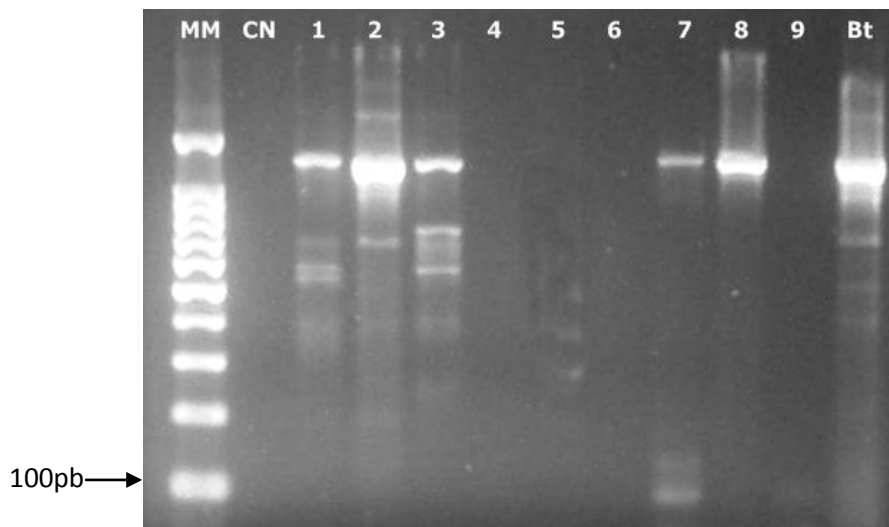


Figura 13- Eletroforese em gel de agarose 1,5% mostrando produto de 1300 pb obtidos da amplificação do DNA dos caramujos coletados na cidade de Arceburgo como primeira etapa da PCR-RFLP.

Fonte: Da autora

Nota: MM, marcador molecular 100pb; colunas 1 a 9, amostras de 1 a 9; CN, controle negativo; Bt, controle positivo de *Biomphalaria tenagophila*.

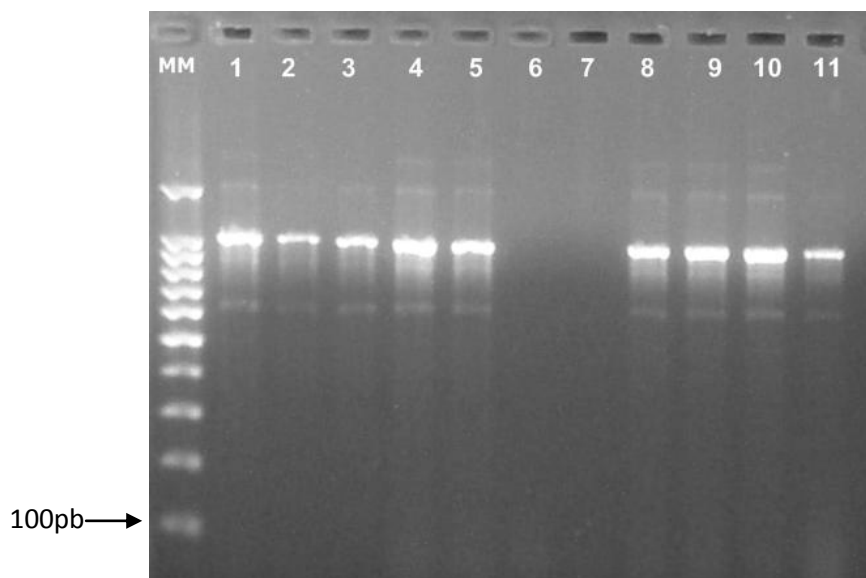


Figura 14- Eletroforese em gel de agarose 1,5% mostrando produto de 1300 pb obtidos da amplificação do DNA dos caramujos coletados na cidade de Fama como primeira etapa da PCR-RFLP.

Fonte: Da autora

Nota: MM, marcador molecular 100pb; colunas 1 a 11, amostras de 65 a 75.

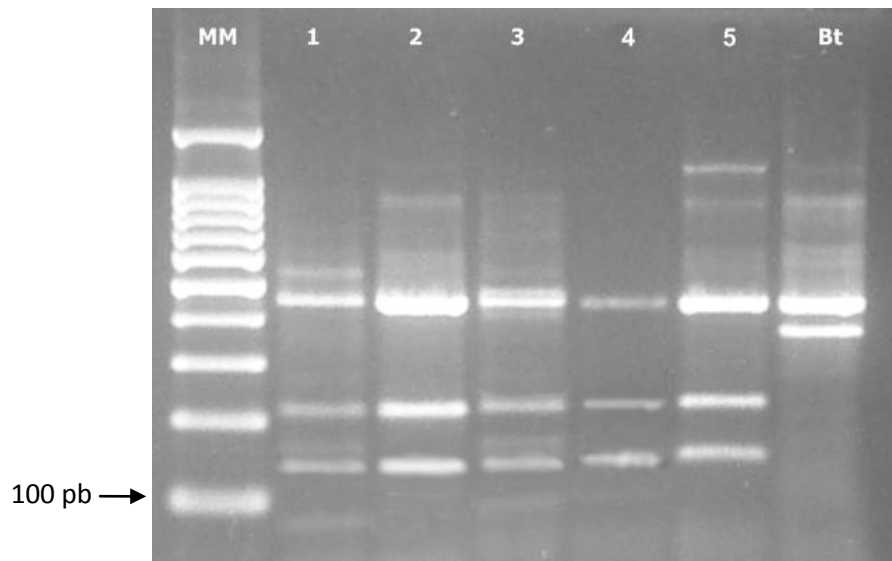


Figura 15- Eletroforese em gel de agarose 2% mostrando os perfis que caracterizam a espécie *Biomphalaria tenagophila guaibenses* após a digestão com a enzima Ddel.

Fonte: Da autora

Nota: MM, marcador molecular 100pb; colunas de 1 a 3, amostras de 1 a 3; coluna 4, amostra 7; coluna 5, amostra 8; Bt, *Biomphalaria tenagophila*.

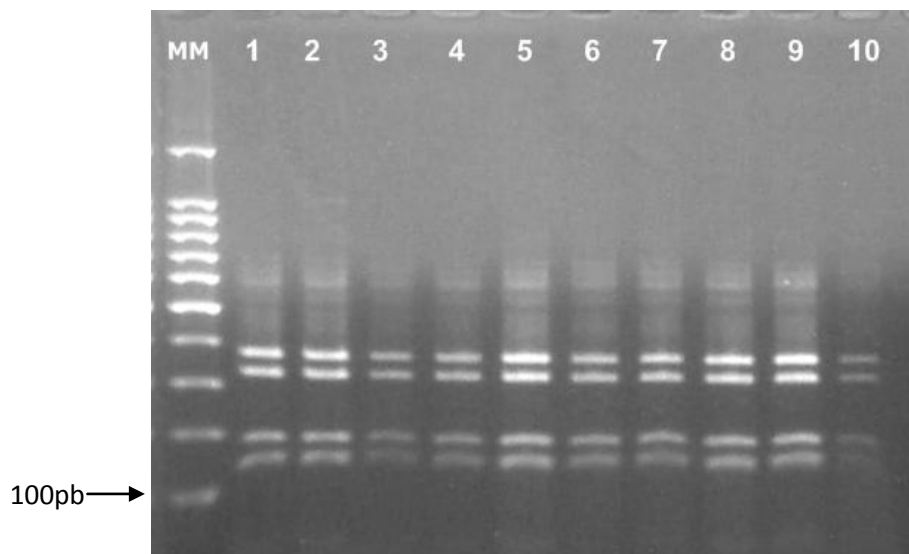


Figura 16- Eletroforese em gel de agarose 2% mostrando os perfis que caracterizam a espécie *Biomphalaria peregrina* após a digestão com a enzima Ddel.

Fonte: Da autora

Nota: MM, marcador molecular 100pb; colunas de 1 a 6, amostras de 64 a 69; coluna 7 a 10, amostras 72 a 75.

6.3.2 Presença de *S. mansoni*

Através da técnica de PCR para pesquisa do parasita no caramujo, feita nos 35 caramujos em que obteve-se a amplificação na PCR anterior, foi possível evidenciar a presença de 2 moluscos positivos provenientes de Arceburgo (figura 17). O restante dos caramujos não apresentaram bandas específicas para presença de *S. mansoni* (figuras 18).

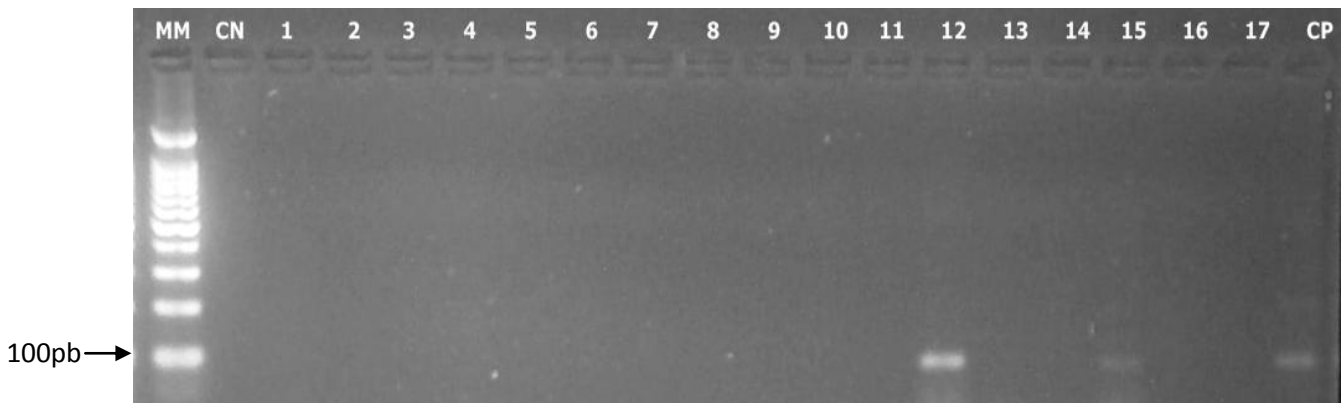


Figura 17- Eletroforese em gel de agarose 2% mostrando produtos da amplificação do DNA dos caramujos provenientes de Arceburgo através da PCR para pesquisa de *Schistosoma mansoni* em caramujo.

Fonte: Da autora

Nota: MM, marcador molecular 100pb; CN, Controle negativo; colunas de 1 a 17, amostras de 1 a 17; CP, controle positivo (verme adulto).

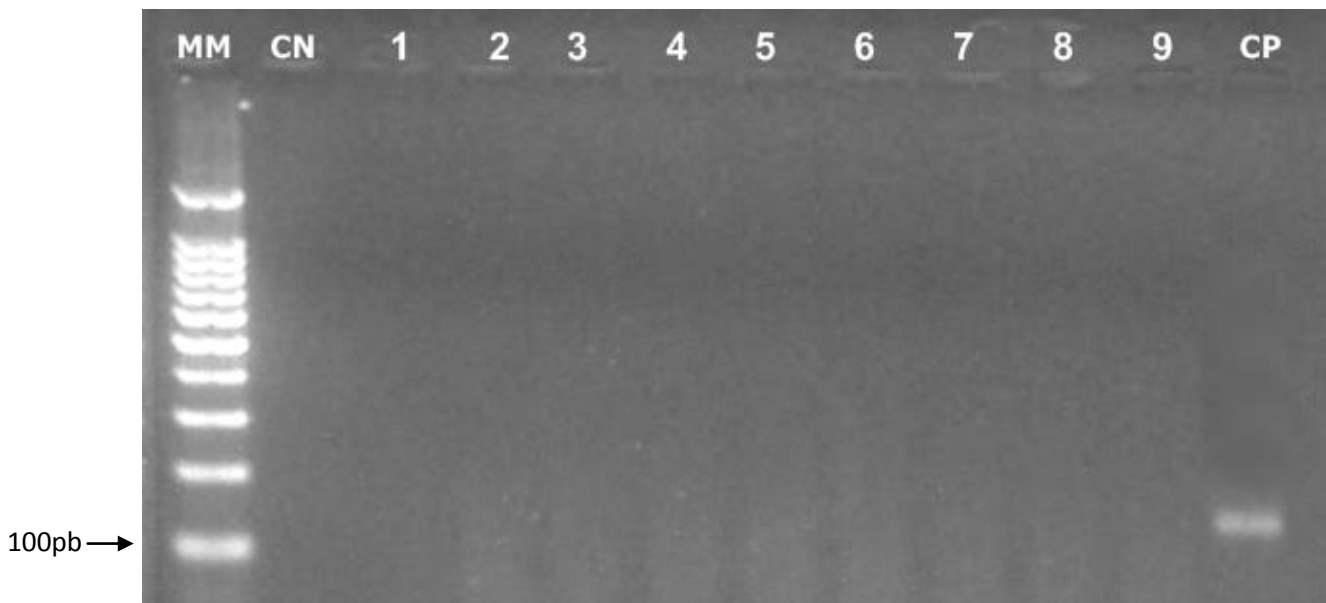


Figura 18- Eletroforese em gel de agarose 2% mostrando produtos da amplificação do DNA dos caramujos provenientes de Fama através da PCR para pesquisa de *Schistosoma mansoni* em caramujo.

Fonte: Da autora

Nota: MM, marcador molecular 100pb; CN, Controle negativo; colunas de 1 a 9, amostras de 56 a 64; CP, controle positivo.

7 DISCUSSÃO

É sabido que a distribuição da esquistossomose mansoni coincide com a distribuição dos moluscos do gênero *Biomphalaria* e por isso o conhecimento sobre os vetores no território brasileiro é de fundamental importância para auxiliar as medidas de controle da esquistossomose. Para isso é necessário realizar a identificação destes hospedeiros intermediários, bem como a detecção de espécies infectadas e/ou potencialmente transmissoras do *S. mansoni*. Durante muito tempo vem sendo utilizada a identificação dos moluscos através da morfologia comparada das conchas, anatomia dos órgãos do aparelho reprodutor e da presença de crista renal. A detecção das cercárias através do exame dos moluscos após exposição a um estímulo luminoso ou esmagamento entre placas de vidro também são utilizadas na rotina laboratorial. Nos últimos anos, a biologia molecular na identificação das espécies de *Biomphalaria* e detecção do parasito vêm ganhando destaque e contribuindo para o conhecimento acerca da epidemiologia da esquistossomose mansoni (MARQUES, 2012). Esta ferramenta vem mostrando grande relevância no diagnóstico pela sua especificidade.

Neste trabalho a PCR foi de suma importância, pois foi possível ultrapassar as dificuldades dos métodos convencionais. Um importante fator que evidencia a relevância das técnicas moleculares na identificação dos moluscos, além de facilitar sua identificação, é o fato de a diferenciação de espécies e subespécies só ser possível com a PCR. Pode-se, por exemplo, diferenciar a espécie *Biomphalaria tenagophila* do *Biomphalaria tenagophila* da linhagem Taim, que tem sua grande importância na transmissão da doença já que é a única linhagem totalmente resistente a infecção (COELHO et al, 2004). Já no que se refere à pesquisa do parasita, foi possível evidenciar que a ferramenta molecular foi extremamente importante, já que através dela pode-se constatar a infecção em dois dos caramujos, o que não foi possível através da pesquisa de cercária.

A possibilidade de utilizar ferramentas moleculares para a identificação de moluscos de importância médica tem contribuído para o aumento do conhecimento do gênero *Biomphalaria*. Anteriormente usava-se a técnica LS-PCR, mas produzia um grande número de bandas, o que complicava a identificação dos marcadores

específicos da espécie (VIDIGAL et al. 1996). Em um estudo feito em 2000 por Vidigal e colaboradores foi demonstrado que a técnica de PCR-RFLP da região ITS do rDNA do *Biomphalaria* utilizando Ddel, permite a diferenciação da maior parte das dez espécies brasileiras *Biomphalaria* examinadas. Em estudos anteriores demonstraram que os perfis de restrição resultantes da digestão com Ddel permitiu a identificação de *B. glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila* (VIDIGAL et al. 1998). Também foi usada essa técnica no estudo de espécies muito semelhantes, como *B. straminea*, *B. intermedia*, *B. kuhniana*, *B. peregrina* (CALDEIRA et al., 1998) e *B. tenagophila*, *B. t. guaibensis* e *B. occidentalis* (SPATZ et al., 1999).

Originalmente usava-se o gel de poliacrilamida 6% corado com prata na técnica de PCR-RFLP (VIDIGAL, 200), porém neste trabalho o gel foi substituído pelo gel de agarose por ser de manuseio mais simples e apresentar melhor resolução.

Epidemiologicamente, a busca de espécies do gênero *Biomphalaria* em uma região é um passo importante para o monitoramento da transmissão da esquistossomose. Neste contexto a principal espécie transmissora da esquistossomose no Brasil é a *B. glabrata*. Esta espécie encontra-se amplamente distribuída pelo território brasileiro, principalmente na região Sudeste e na região Nordeste (PARAENSE, 1986). A *B. straminea* apresenta uma densidade populacional alta no Nordeste brasileiro, mas apresenta baixas taxas de infecções naturais. Caramujos desta espécie são altamente suscetíveis à infecção de maneira que estes morrem devido à infecção. A espécie *B. tenagophila*, possui várias linhagens geográficas com vários graus de resistência à infecção pelo *S. mansoni*, sendo encontradas algumas suscetíveis e outras totalmente resistentes ou refratárias (COELHO, 1995). Em comparação com a *B. glabrata*, *B. tenagophila* apresenta-se mais resistente à infecção pelo *S. mansoni* (SILVA et al., 1994; SOUZA et al., 1995). No presente trabalho foram encontrados exemplares da espécie *B. tenagophila* e *B. peregrina*.

No que diz respeito a *B. tenagophila* sua importância epidemiológica na transmissão da esquistossomose vem crescendo pelo território brasileiro. Antigamente ela era responsável pela transmissão apenas na Argentina e região sul do Brasil. Atualmente esta espécie é responsável pela transmissão da esquistossomose em vários locais da região sudeste, principalmente nos estados de

São Paulo e Minas Geais. Paraense & Corrêa (1978) testaram a suscetibilidade de *B. tenagophila* de 18 localidades do Brasil à infecção por uma determinada linhagem de *S. mansoni*, e encontraram taxas de infectividade que variaram de 0 a 91,5%. Martins-Souza (1999), demonstrou que caramujos *B. tenagophila* de Cabo Frio são mais susceptíveis à cepa LE de *S. mansoni*, uma vez que estes apresentaram taxa de positividade que pode chegar a 40%. Uma população de *B. tenagophila* originária da Lagoa da Pampulha, Belo Horizonte, foi testada por Souza et al. (1987), quanto a sua potencialidade em se tornar hospedeira de diferentes cepas de *S. mansoni*. Para tanto os autores utilizaram as cepas "LE" e "HK" (de fezes de pacientes residentes próximo a Pampulha) de Belo Horizonte, "AL" de Alagoas e "SJ" de São Jose dos Campos, São Paulo e as taxas de infecção obtidas foram de 4% (cepa "LE"), 6% (cepa "HK"), 30% (cepa "SJ") e 40% (cepa "AL"). O fato da espécie *B. tenagophila* ter sido encontrado em Arceburgo, associado aos dados referidos acima e ao fato de dois dos caramujos coletados se apresentarem infectados, ressalta a importância de se estabelecer um programa de vigilância na região. Apesar da baixa taxa de infectividade (2 em 35), baseado no estudo de Souza et al. (1987), conclui-se que a linhagem de *B. tenagophila* encontrada pode ser mais suscetível a outras cepas de *S. mansoni* e a exposição destes caramujos a diferentes cepas de *S. mansoni* é facilitada pelo grande fluxo de migrantes vindos de várias regiões endêmicas para a esquistossomose. Em relação a *B. pelegrina*, até o momento esta espécie não foi encontrada naturalmente infectada, porém está já foi infectada pelo *S. mansoni* em condições de laboratórios, mostrando seu potencial em se tornar transmissor da esquistossomose.

No Brasil, temos dez espécies de moluscos do gênero *Biomphalaria*, mas somente *Biomphalaria glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea* foram encontrados eliminando cercárias em ambientes naturais. (BRASIL, 2008). Em um trabalho realizado na região sudoeste de Minas Gerais relatara a ocorrência de esquistossomose, em área adjacente ao reservatório de Furnas, alertava-se a necessidade de um estudo de vigilância na região, preocupados com a possibilidade desse reservatório vir a se constituir em foco da doença (CARVALHO et al., 1989). Como podemos observar no mapa abaixo, grande parte da região estudada tem predominância da cultura de café e cana-de-açúcar (figura 19) o que

favorece a atração de migrantes de regiões endêmicas para esquistossomose, considerando-se que esta é a maioria da mão de obra contratada para trabalhar nesses locais (VIEIRA Jr., 2013). Estes fatos tem grande influência no estabelecimento da infecção em uma região antes considerada indene a doença, já que alguns indivíduos provenientes de áreas endêmicas estão infectados com o parasita, como observado no mapa, onde podemos evidenciar a presença de casos humanos de esquistossomose próximos aos focos de *B. tenagophila*, o que possivelmente explica o aparecimento dos hospedeiros infectados neste trabalho.

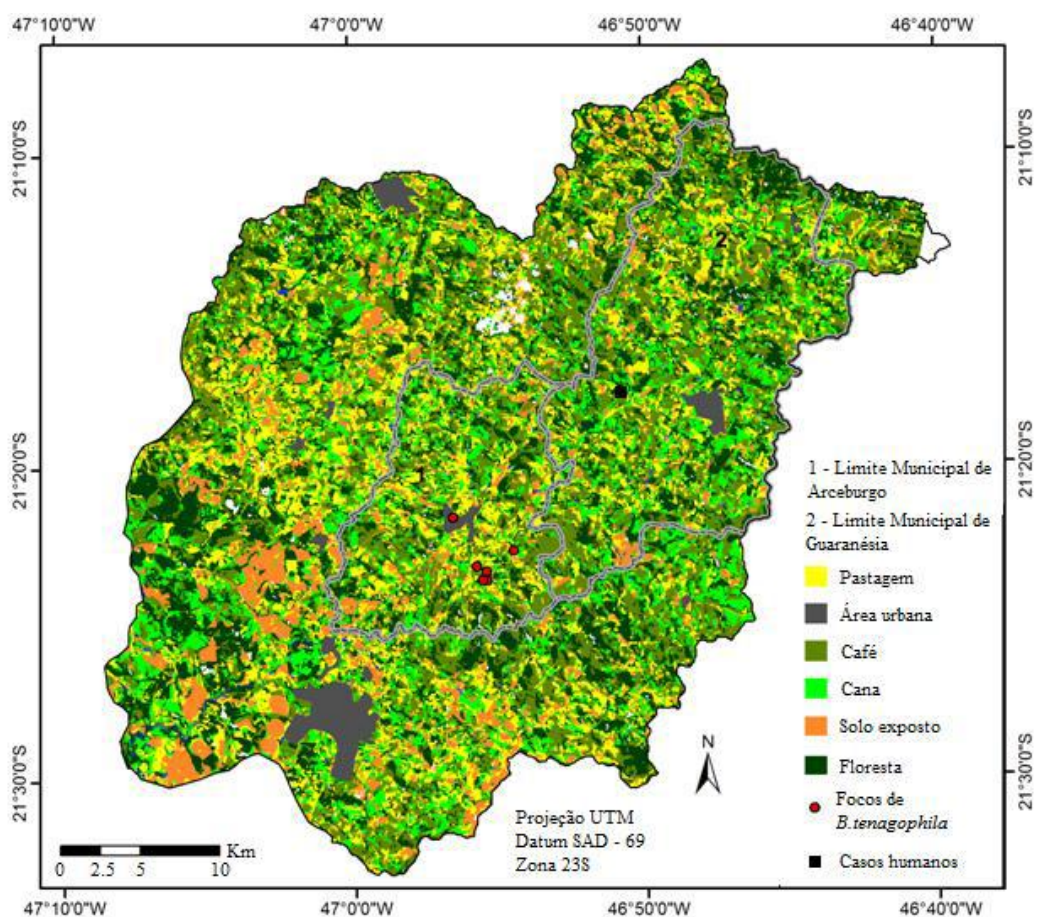


Figura 19- Mapa de uso e ocupação de solo evidenciando a cultura de café e cana-de-açúcar na região e pontos denotando os locais onde foram encontrados caramujos e pessoas infectadas na área de estudo

Fonte: Vieira Jr., 2013

8 CONCLUSÃO

A PCR tem se mostrado uma ferramenta muito útil quando se trata da identificação dos caramujos, visto que a identificação convencional se mostra algumas vezes complicada e nem sempre é eficiente na caracterização de subespécies; e também quanto à pesquisa do parasita no molusco, uma vez que a técnica molecular é capaz de detectar a infecção no período pré-patente. O aparecimento de caramujos transmissores da esquistossomose infectados em uma região antes livre da infecção é um grande alerta para que se façam melhores estudos de vigilância e controle da doença e monitoramento dos migrantes provenientes de regiões endêmicas já que a presença dos moluscos associados ao fluxo de pessoas infectadas pelo parasita na região, devido a cultura de café e de cana de açúcar, pode estar associada ao surgimento dos vetores infectados e possivelmente pode facilitar o estabelecimento da infecção.

REFERÊNCIAS

ALAN WILSON, R., et al. The detection limits for estimates of infection intensity in schistosomiasis mansoni established by a study in non-human primates. **Int J Parasitol**, v. 36, n. 12, p.1241-4. 2006

ANARUMA FILHO, F.; SANTOS, R.F. Indicadores da relação entre estrutura da paisagem, degradação ambiental e esquistossomose mansoni. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 2007, Minas Gerais. **Anais...** Minas Gerais, 2007, v. 8, p. 1-2.

BARSOUM, R. S.; ESMAT, G.; EL-BAZ, T. Human Schistosomiasis: Clinical Perspective: Review. **Journal of Advanced Research**, v. 4, n. 5, p. 433–444, 2013.

BDUL-FATTAH, M. M., et al. Diagnosis of early pre-patent schistosomiasis by cystatin capture enzyme-linked immunosorbent assay. **J. Egypt. Soc. Parasitol.** v. 30, n. 2, p. 621-630. 2000.

BENNETT J. L, et al. The development of resistance to anthelmintics: A perspective with an emphasis on the antischistosomal drug praziquantel. **Experimental Parasitology**, v. 87, n. 3, p. 260-267, 1997.

BERRAHAL F., et al. Factors associated with visceral leishmaniasis in Nepal: bed-net use is strongly protective. **Am j Trop Med Hyg**, v. 63, n 3, p. 184-188, 1996.

BERRY A, et al. Contribution of PCR- based methods to diagnosis and management of imported malaria. **Med Trop (Mars)**.; v. 65, n 2, p. 176-83, 2005

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)**. Brasília, 2008. 178 p.

CALDEIRA R.L., et al. Molecular identification of similar species of the genus Biomphalaria (Mollusca: Planorbidae) determined by a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. **Mem Inst Oswaldo Cruz** v. 93, n. 1, p. 219-225, 1998.

CALDEIRA, R. L.; JANNOTTI-PASSOS, L. K.; CARVALHO, O. S. Molecular epidemiology of Brazilian Biomphalaria: a review of the identification of species and the detection of infected snails. **Acta tropica**, v. 111, n. 1, p. 1–6, 2009.

CARDIM, L. L. et al.. Avaliação da Esquistossomose Mansônica mediante as Geotecnologias e Técnicas Multivariadas no Município de Jacobina, Bahia. **Revista Baiana de Saúde Pública**, v. 32, n. 1, p. 29-42, 2008.

- CARLSGART J., ROEPSTORFF A., NEJSUM P. Multiplex PCR on single unembryonated *Ascaris* (roundworm) eggs. **Parasitol Res** v. 104, n 4, p. 939-943, 2009.
- CARVALHO, S. O., COELHO, P. M. Z., LENZI, H. L., ***Scistosoma mansoni* e Esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. Rio de Janeiro. Editora Fiocruz, 2008.
- CHITSULO L, et al. The global status of schistosomiasis and its control. **Acta Tropica**, v. 77, n 1, p. 41-51, 2000.
- CHITSULO, L., LOVERDE, P., ENGELS, D., Schistosomiasis. **Nat Rev Microbiol** v. 2, n. 1, p. 12-13. 2004.
- CIOLI D, PICA-MATTOCIA L. Praziquantel. **Parasitology Research**, v. 90, n 1, p. 3-9, 2003.
- CLARA E SILVA L. M. et al. Differential diagnosis of dog hookworms based on PCR-RFLP from the ITS region of their rDNA. **Vet Parasitol** v. 140, n 3, p. 373-377, 2006.
- CLERINX, J.; VAN GOMPEL, A. Schistosomiasis in travellers and migrants. **Travel medicine and infectious disease**, v. 9, n. 1, p. 6–24, jan. 2011.
- COELHO M.V. O parasito *Schistosoma mansoni*. **São Paulo: Editora Savier**, Cap. 1, p. 1-12, 1970.
- COELHO, P. M. Z et al. *Biomphalaria tenagophila*/*Schistosoma mansoni* interaction: Current Knowledge and Perspectives for its Application on the Control of Schistosomiasis mansoni. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 5, p. 109-111. 2004
- CONLON, C. P. Schistosomiasis. **Medicine**, v. 33, n. 8, p. 64–67, ago. 2005.
- DA SILVA, L. C.; CHIEFFI, P. P.; CARRILHO, F. J. Schistosomiasis mansoni – Clinical features. **Gastroenterología y Hepatología**, v. 28, n. 1, p. 30–39, jan. 2005.
- DELIDOW, B. C., et al. PCR protocols: current methods and applications. **Edition A White**, 2 pp., 1993.
- DELGADO, R. Parasitas intestinais em crianças de uma região rural da Guiné-Bissau: prevalência e relação com o estado nutricional. 2009-2010. Mestrado em Biologia Humana e Ambiente. Faculdade de Ciências (FC). Universidade de Lisboa (UL).
- ENGELS, D., et al. The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. **Acta Tropica**. ;v. 82 n. 2 p. 139–146. 2002

GILBER, S. R. Reação em Cadeia da Polimerase em Comparação com o Teste de Imunofluorescência Indireta (ifi) e Elisa (enzimaimunoensaio) no Diagnóstico para a Doença de Chagas. Disponível: <<http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/handle/1884/18304/Dissertacao%20Formatadasoraia%20pdf.pdf;jsessionid=D00FE7C0B96124659D9052B00680EE0A?squence=1>>. Acessado em: 03 ago 2013.

GRYSEELS, B. Schistosomiasis. **Infectious disease clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 383–97, 2012.

HAMBURGUER, J. et al. Highly repeated short DNA sequences in the genome of *Schistosoma mansoni* recognized by a species specific probe. **Mol Biochem Parasitol** v. 44, n. 1, p. 73–80. 1991.

HAMBURGUER, J., et al. Development and evaluation of a polymerase chain reaction for monitoring *Schistosoma mansoni* infestation of water. **Am J Trop Med Hyg** v. 59, n. 3, p. 468–473. 1998.

HEID, C. A., LIVAK, K. J., WILLIAMS, P. M. Real time quantitative PCR. **Genome Research** v. 6, n 10, p. 986-994, 1996.

HIGUCHI, R., et al. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology Nature Publishing Company** v. 11, n 9, p. 1026-1030, 1993

HODGKINSON J. E., et al. Identification of strongyle eggs from anthelmintic-treated horses using a PCRELISA based on intergenic DNA sequences. **Parasitol Res** v. 95, n 4, p. 287–292, 2005.

KANAMURA, H. Y. et al. IgM-immunofluorescence test as a diagnostic tool for epidemiologic studies of Schistosomiasis in low endemic areas. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 97, n. 4, p. 485-9, 2002.

KATZ, N., CHAVES, A. & PELLEGRINO, J.. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in Schistosomiasis mansoni. **Rev Inst Med Trop**, v. 14, n 6 p. 397-400, 1972

KATZ N, et al. Rate of action of schistosomicides in mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 22, n 4, p. 183-186, 1989.

KUBISTA, M., et al. The realtime polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n 2, p. 95-125, 2006.

LACHAUD L., et al. Value of two PCR methods for diagnosis of canine visceral leishmaniasis and the detection of asymptomatic carriers. **Parasitology**, v. 125, n 3, p. 197-207, 2002.

LIN, D. D., et al. Routine Kato-Katz technique underestimates the prevalence of *Schistosoma japonicum*: a case study in an endemic area of the People's Republic of China. **Parasitol Int**, v. 57, n. 3, p. 281-6, 2008.

MARINS-SOUZA, R. L. **Fatores associados à resistência de *Biomphalaria tenagophila* na infecção por *Schistosoma mansoni***. 1999. 83 f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1999

MARQUES, D.P.A., **Monitoramento da inserção do patrimônio genético de *Biomphalaria tenagophila* do Taim (RS), linhagem resistente ao *Schistosoma mansoni*, após a sua introdução em uma área endêmica para esquistossomose no Município de Bananal/SP, com transmissão mantida por *B. tenagophila***. 2012. Mestrado em em Ciências da Saúde. Centro de Pesquisas René Rachou, CPqRR, Belo Horizonte, 2012

MIGUEL, A.L.C.F.S., **Aplicação da técnica de PCR na pesquisa de bactérias patogênicas em biofilmes de condutas e reservatórios de água do sistema de distribuição da EPAL**. 2007. Dissertação (Mestrado) – Universidade Técnica de Lisboa

MOCHIZUKI R, ENDOH D, ONUMA M, FUKUMOTO S. PCR-based Species-Specific Amplification of ITS of *Mecistocirrus digitatus* and ITS Application in Identification of GI Nematode Eggs in Bovine Faeces. **J Vet Med Sci**, v. 68, n 4, p. 345-351, 2006.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 12 ed. São Paulo: Atheneu, 2011.

OLIVEIRA G. C, BAHIA D. The genome of *Schistosoma mansoni*. **Proceeding of the third Brazilian Symposium of Mathematical and Computational Biology**, v. 1, p. 101-115, 2004.

OLIVEIRA, E. J., KANAMURA, H. Y. & LIMA, D. M. Efficacy of an enzyme-linked immunosorbent assay as a diagnostic tool for schistosomiasis mansoni in individuals with low worm burden. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 4, p. 421-5, 2005.

PARAENSE, W. L. Estado atual da sistemática dos planorbídeos brasileiros. **Arquivo Museu Nacional Rio de Janeiro**, v.55, p. 105-128, 1975.

PECSON B. M., et al. A Real-Time PCR Method for Quantifying Viable Ascaris Eggs Using the First Internally Transcribed Spacer Region of Ribosomal DNA. **Appl Environ Microbiol** v. 72, n 12, p. 7864-7872, 2006.

PELLEGRINO J, COELHO P. M. Z. *Schistosoma mansoni*, wandering capacity of a worm couple. **Journal of Parasitology**, v. 64, n 1, p. 181, 1978.

PEIXOTO, L. E.; MACHADO, M. I. Vigilância ambiental em saúde: ocorrência de *Biomphalaria peregrina* e *B. schrammi* em áreas de influência da usina hidrelétrica de Miranda, Minas Gerais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA

SANITÁRIA E AMBIENTAL, 2005, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande, v.23, p. 1-9, 2005.

PICA-MATTOCCIA L, DIAS L. C. S, ARCHER S. Binding of oxaminiquine to DNA of schistosomes. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n 3, p. 89-96, 1989.

PONTES, L. A.; DIAS-NETO, E.; RABELLO, A. Detection by polymerase chain reaction of *Schistosoma mansoni* DNA in human serum and feces. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 66, n. 2, p. 157–62, fev. 2002.

REDMAN C, ROBERTSON A, FALLON P. G, MODENA J, KUSEL G R, DOENHOFF M.J. Praziquantel, na urgent and exciting challeng. **Parasitology Today**, v. 12, n 3, p. 14-20, 1996.

REITHINGER, R. et al. Use of PCR to detect *Leishmania (Viannia)* spp. In dog blood and bone marrow. **Jornla of Microbiology**, v. 38, n 2, p. 748-751, 2000.

RIBEIRO F, et al. The effect of Praziquantel treatment on glutathione concentration in *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**, v. 116, n 3, p. 229-236, 1998.

SCHONIAN G., et al.. Leishmaniases in the Mediterranean in the era of molecular epidemiology. **Trends Parasitol**, v. 24, n 3, p. 135-142. 2008.

SINGH, B. Molecular Methods for Diagnosis and Epidemiological Studies of Parasitic Infections. **Int J Parasitol** v. 27, n 10, v. 1135-1145, 1997

SOLANO-GALEGO, L., et al. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in área of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. **Jornal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 560-663, 2001.

SORGHO, H., et al. Serodiagnosis of *Schistosoma mansoni* infections in an endemic area of Burkina Faso: performance of several immunological tests with different parasite antigens. **Acta Trop**, v. 93,n. 2, p. 169-80, 2005.

SPATZ L, et al. Molecular study of similar *Biomphalaria* species. **Mem Inst Oswaldo Cruz** v 93, n 1, p 169-170, 1998..

STEINMANN, P., et al. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. **Lancet Infectious Diseases**. v. 6, n. 7, p. 411–425. 2006

VALADARES T. E, et al. *mansoni*: Aspectos da oviposição da cepa LE em camundongos infectados com um casal de vermes. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 23, p. 6, 1981.

VIDIGAL, T. H. D. A. et al. A low stringency polymerase chain reaction approach to the identification of *Biomphalaria glabrata* and *B. tenagophila*, intermediate snail

hosts of *Schistosoma mansoni* in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 6, Dec. 1996 .

VIDIGAL T. H. D. A, et al. *Biomphalaria* sp: identification of the intermediate snail hosts of *Schistosoma mansoni* by polymerase chain reaction amplification and restriction enzyme digestion of the ribosomal RNA gene intergenic spacer. **Exp Parasitol** v. 89, n. 2 p. 180-187, 1998a.

VIEIRA JÚNIOR, R.S. et al. Sensoriamento remoto aplicado na espacialização de esquistossomose no sul-sudoeste do Estado de Minas Gerais. Anais XVI Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto - SBSR, Foz do Iguaçu, PR, Brasil, 13 a 18 de abril de 2013, INPE.

VIDIGAL, T. H. D. A. et al Further Studies on the Molecular Systematics of *Biomphalaria* Snails from Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 95, n 1, p. 57-66, 2000.

WEST D.F., PAYETTE T., MUNDY T., BLACK IV W.C.. Regional molecular genetic key of thirteen snow pool *Aedes* species (Diptera: Culicidae) in northern Colorado. **J Med Entomol** v 34, n 4, p 404-410, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Tropical Diseases Research. Schistosomiasis and soil transmitted helminth infections. Geneva: World Health Organization, 2011.