MARCIA OLIVEIRA CASOTTI

**Diagnóstico da infecção de *Biomphalaria glabrata* por
Schistosoma mansoni em área de baixa endemicidade no
Estado de São Paulo, utilizando técnicas de biologia molecular**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Programa de Moléstias Infecciosas e
Parasitárias

Orientadora: Prof^a. Dra. Maria Cristina
Carvalho do Espírito Santo

**São Paulo
2019**

MARCIA OLIVEIRA CASOTTI

**Diagnóstico da infecção de *Biomphalaria glabrata* por
Schistosoma mansoni em área de baixa endemicidade no
Estado de São Paulo, utilizando técnicas de biologia molecular**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Programa de Moléstias Infecciosas e
Parasitárias

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina
Carvalho do Espírito Santo

**São Paulo
2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Casotti, Marcia Oliveira

Diagnóstico da infecção de *Biomphalaria glabrata*
por *Schistosoma mansoni* em área de baixa
endemicidade no estado de São Paulo, utilizando
técnicas de biologia molecular / Marcia Oliveira
Casotti. -- São Paulo, 2019.

Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientadora: Maria Cristina Carvalho do Espírito
Santo.

Descritores: 1.Epidemiologia molecular
2.Esquistossomose 3.Diagnóstico 4.*Biomphalaria*
5.Vigilância 6.Helmintos

USP/FM/DBD-299/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Nome: CASOTTI, Marcia Oliveira

Título: Diagnóstico da infecção de *Biomphalaria glabrata* por *Schistosoma mansoni* em área de baixa endemicidade, no Estado de São Paulo, utilizando técnicas de biologia molecular

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a).

Instituição:

Julgamento:

Prof(a). Dr(a).

Instituição:

Julgamento:

Prof(a). Dr(a).

Instituição:

Julgamento:

*Aos meus pais, Nivaldo Marcos Marson Casotti e
Maria Aparecida Oliveira Brasil Casotti.*

*“A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios.
Por isso, cante, ria, dance, chore e viva intensamente
cada momento de sua vida, antes que a cortina se feche e
a peça termine sem aplausos.”
(Charlie Chaplin)*

Em memória de minha avó, Luísa Maria Marson Casotti.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Maria Aparecida Oliveira Brasil Casotti e Nivaldo Marcos Marson Casotti, pela educação esforço e contribuição que sempre forneceram na minha formação e crescimento pessoal e profissional.

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Cristina Carvalho do Espírito-Santo, pelo incentivo e conhecimento transmitidos com sua experiência, bem como à compreensão e auxílio nos momentos de dificuldade.

À Dra. Michele Gomes Gouvêa por todo o suporte e contribuição com a execução e treinamento das atividades laboratoriais, à ajuda demonstrada nas questões burocráticas mais complicadas que envolviam o projeto, análise dos dados e desenvolvimento desta dissertação.

À Samira Chuffi por contribuir e auxiliar na etapa experimental, em um momento de grande dificuldade.

À Maria Cristina Conceição Mello por todo o auxílio e competência demonstrado na execução das tarefas que lhe foram designadas.

Ao Dr. Pedro Luís Silva Pinto pela ajuda, colaboração e preocupação com desenvolvimento do projeto, bem como, na colaboração e treinamento em algumas etapas solicitadas após o período da qualificação.

À Dra. Fabiana Martins de Paula pelos conselhos, orientações e colaboração na metodologia do trabalho.

Ao Prof. Dr. Ronaldo Cesar Borges Gryscek por abrir as portas do laboratório para mim, me recepcionar e possibilitar o desenvolvimento do trabalho.

À Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN), em especial à Dra. Roseli Tuan pela ideia do projeto integrado, pelo preparo e orientação no ambiente de pesquisa, pelos conhecimentos transmitidos e oportunidade concedida.

À Gabriela Rodrigues Fonseca e demais colegas pelos conselhos, esclarecimentos e força nas horas de dúvidas e dificuldades.

Ao Prof. Dr. Thales de Brito e Dra. Ana Maria Gonçalves de Abreu, pelo auxílio e elucidação durante o desenvolvimento dos ensaios histológicos.

À Dra. Filumena Gomes pela contribuição com a organização da dissertação e o constante estímulo.

A todos os funcionários do Laboratório de Imunopatologia da Esquistossomose (LIM-06) e do Laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia Tropical (LIM-07), Departamento de Gastroenterologia, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, pelo auxílio técnico e por permitir o desenvolvimento deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por acreditar e conceder auxílio à pesquisa para que esse trabalho fosse realizado com sucesso. (Processo 2016/23742-0).

“Minha imagem no espelho já sabe que não sabe nada, e por isso me ensina.”
(Gabriel, O Pensador)

RESUMO

Casotti MO. Diagnóstico da infecção de *Biomphalaria glabrata* por *Schistosoma mansoni* em área de baixa endemicidade, no Estado de São Paulo, utilizando técnicas de biologia molecular [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2019.

Aproximadamente 240 milhões de pessoas no mundo estão infectadas pelo *Schistosoma mansoni* (*S. mansoni*). No Brasil, os principais objetivos do programa de controle da esquistossomose são os de reduzir a infecção humana em áreas endêmicas, e de conter sua expansão. O principal hospedeiro intermediário deste parasita é o caramujo *Biomphalaria glabrata* (*B. glabrata*). O diagnóstico convencional da infecção por *S. mansoni* em *Biomphalaria* feito rotineiramente é ineficaz mediante algumas condições. Assim, o objetivo desse estudo foi desenvolver e padronizar técnicas moleculares sensíveis e específicas para detectar a infecção por *S. mansoni* em caramujos *B. glabrata* procedentes de uma área de baixa endemicidade (Ourinhos/SP). Moluscos de Ourinhos/SP foram adequadamente transportados para o Laboratório de Imunopatologia da Esquistossomose da Universidade de São Paulo (LIM-06), que já mantinha rotineiramente moluscos *B. glabrata*, linhagem BH. Foram testados protocolos da Reação em Cadeia da Polimerase convencional (cPCR) e TaqMan® Reação em Cadeia da Polimerase (*TaqMan*®*qPCR*) para o diagnóstico da infecção no molusco. Dois grupos com 10 caramujos por linhagem (BH e Ourinhos) foram expostos a crescentes cargas parasitárias (1, 5, 10, 20, 30 miracídios) de *S. mansoni* (BH) e avaliados em dois períodos diferentes do ciclo assexuado: 72 horas e 14 dias após exposição. A extração de DNA de *S. mansoni* (BH) foi realizada em tecido da região cefalopodal dos caramujos utilizando o QiAmp® DNA MiniKit (Qiagen). O DNA extraído foi quantificado em Nanodrop®. Para amplificação, utilizou-se três *primers* sendo as sequências 28S do DNAr (cPCR), COX 1 do DNAm e sequência de repetição em *tandem* (*TaqMan*®*qPCR*). A visualização dos produtos de amplificação do DNA na cPCR foi feita em gel de agarose 2%, na *TaqMan*®*qPCR* os dados foram interpretados com valores expressos em Ct (*Cycle Threshold*). Realizou-se a inoculação de hamsters com cercárias oriundas de *B. glabrata* (Ourinhos/SP) infectados com miracídios BH. Observamos os seguintes resultados: implantação da linhagem laboratorial de *B. glabrata* (Ourinhos/SP); Presença de bandas nítidas com 350 pb na reação de cPCR, além de produtos de amplificação do DNA de *S. mansoni* na *TaqMan*®*qPCR* expressos em Ct (*Cycle Threshold*). Essa positividade foi observada em ambos os períodos pós-exposição nos dois métodos moleculares empregados. A presença de alterações anatomopatológicas no hamster infectado, demonstra a capacidade que esse molusco tem de completar seu ciclo infeccioso. Os resultados demonstram que, mesmo em condições de restrição experimental, esse molusco foi capaz de se reproduzir e manter um novo ciclo laboratorial de uma nova linhagem *B. glabrata* (Ourinhos/SP). Além disso, as técnicas moleculares foram sensíveis na detecção do DNA dos moluscos Ourinhos infectados pelo *S. mansoni* cepa BH. Portanto, é um estudo que poderá promover o monitoramento e a gestão das coleções hídricas nas áreas de baixa endemicidade melhorando o impacto dessa parasitose na qualidade de vida dessas populações.

Palavras-chave: Epidemiologia Molecular. Esquistossomose. Diagnóstico. *Biomphalaria*. Vigilância. Helmintos.

ABSTRACT

Casotti MO. Diagnose of *Schistosoma mansoni* infection of *Biomphalaria glabrata* in an area of low endemicity in the State of São Paulo using molecular biology techniques [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2019.

Approximately 240 million people worldwide are infected with *Schistosoma mansoni* (*S. mansoni*). In Brazil, the main objectives of the schistosomiasis control program are to reduce human infection in endemic areas, and to restrain its expansion. The main intermediate host of this parasite is the snail *Biomphalaria glabrata* (*B. glabrata*). The conventional diagnosis of *S. mansoni* infection in *Biomphalaria* is routinely inappropriate under some conditions. The objective of this study was to develop and standardize sensitive and specific molecular techniques to detect *S. mansoni* infection in *B. glabrata* snails from an area of low endemicity (Ourinhos/SP). Molluscs from Ourinhos/SP were adequately transported to the Laboratory of Immunopathology of Schistosomiasis in University of São Paulo (LIM-06), which already routinely kept *B. glabrata* molluscs, BH lineage. Conventional Polymerase Chain Reaction (cPCR) protocols and *TaqMan*® Polymerase Chain Reaction (*qPCR TaqMan*®) were tested for molluscum infection diagnosis. Two groups of 10 snails per lineage (BH and Ourinhos) were exposed to increasing parasitic loads (1, 5, 10, 20, 30 miracidies) of *S. mansoni* (BH) and evaluated in two different periods of the asexual cycle: 72 hours and 14 days after exposure. Extraction of *S. mansoni* (BH) DNA was performed on cephalopodal region tissue of snails using *QiAmp DNA MiniKit*® (Qiagen). The extracted DNA was quantified in *Nanodrop*®. For amplification, three primers of the 28S rDNA sequences (cPCR), COX 1 from mtDNA and *tandem repeat* (*qPCR TaqMan*®) were used. Visualization of the DNA amplification products in the cPCR was done on 2% agarose gel, in *TaqMan*® *qPCR* the data were interpreted with values expressed in Ct (*Cycle Threshold*). In addition, hamsters were inoculated with cercariae from *B. glabrata* Ourinhos/SP infected with BH miracidia. We observed the following results: implantation of the laboratory lineage of *B. glabrata* Ourinhos/SP; presence of clear bands with 350 bp in the cPCR reaction, in addition to amplification products of *S. mansoni* DNA in *TaqMan*® *qPCR* expressed in Ct (*Cycle Threshold*). This positivity was observed in both post-exposure periods of the two molecular methods employed. The presence of anatomopathological changes in infected hamsters demonstrates that, even under conditions of experimental restriction, this mollusk was able to reproduce and maintain a new laboratory cycle of a new lineage, and completing the asexual cycle in the intermediate host and the sexual cycle in the final host *B. glabrata* (Ourinhos/SP). Thus, molecular techniques were sensitive and specific in detection of the DNA from molluscs Ourinhos/SP infected by *S. mansoni* strain BH. Positivity of both molecular methods anticipate the diagnosis of molluscum when compared to traditional methods. Therefore, it is a study, which increases pre-patent diagnostic stage of infection, and can promote the monitoring and management of water collections in low endemic areas, improving the impact of this parasite on the quality of life of these populations.

Keywords: Molecular Epidemiology. Schistosomiasis. Diagnosis. *Biomphalaria*. Surveillance. Helminths.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo biológico de <i>S. mansoni</i>	2
Figura 2 - Mapa modificado da distribuição das bacias hidrográficas do Estado de São Paulo com destaque ao trecho médio do Paranapanema.....	5
Figura 3 - Mapa de localização da área de estudo no município de Ourinhos/SP....	6
Figura 4 - Mapa de localização das microbacias hidrográficas no perímetro urbano de Ourinhos/SP.....	7
Figura 5 - Morfologia do <i>B. glabrata</i>	10
Figura 6 - Desenho do estudo para avaliação de caramujos <i>B. glabrata</i> de Ourinhos infectados experimentalmente com miracídeos de <i>S. mansoni</i> linhagem BH.....	17
Figura 7 - Transporte de caramujos coletados do campo, embebidos em gaze umedecida com água, para o laboratório conforme normas estabelecidas pelo Ministério da Saúde.....	19
Figura 8 - Cronograma experimental utilizado para realização dos testes moleculares de caramujos Ourinhos/SP e BH/IMT expostos a crescentes cargas parasitárias de <i>S. mansoni</i> (BH).....	22
Figura 9 - Nomenclatura designada para identificação das amostras submetidas ao diagnóstico por cPCR e qPCR da presença de <i>S. mansoni</i>	22
Figura 10 - Retirada da concha para secção da massa cefalopodal com auxílio de lupa 100x.....	23
Figura 11 - Anatomia do <i>Biomphalaria</i>	24
Figura 12 - Desenho do estudo ilustrando diagrama referente à etapa inicial proposta no emprego das técnicas moleculares.....	26
Figura 13 - Cronograma da avaliação parasitológica de hamsters infectados por <i>S. mansoni</i> originária de caramujos cepa BH (IMT) e Ourinhos/SP.....	29
Figura 14 - Resultado da criação experimental de <i>B. glabrata</i> desenvolvida a partir de cinco caramujos coletados de Ourinhos/SP.....	31
Figura 15 - Gel de amplificação em agarose 2%, ilustrando os produtos de PCR de 20 casais de verme adulto de <i>S. mansoni</i> , utilizando <i>primer</i> espécie-específico, subunidade 28S do DNAr, originando sequências com 395 pb (1-5) e controle negativo (6).....	32
Figura 16 - Gel de amplificação em agarose 2%, ilustrando os produtos de PCR de 20 casais de verme adulto de <i>S. mansoni</i> , COX1 do DNAm, originando sequências com 99 pb (1-5) e controle negativo (6).....	33
Figura 17 - Blast resultante do sequenciamento do cPCR utilizando <i>primer</i> Smcyt748F, amplificando o gene COX do DNAm de <i>S. mansoni</i>	33
Figura 18 - Blast resultante do sequenciamento do produto de cPCR utilizando <i>primer</i> SmR e SmF, amplificando subunidade 28S do DNAr de <i>S. mansoni</i>	34
Figura 19 - Amplificação exponencial das amostras descritas na Tabela 3, ilustrando o limiar de amplificação relatado em Ct, ($\Delta Rn \pm 0,14$).....	35

Figura 20 - Amplificação exponencial das amostras descritas na Tabela 4, ilustrando o limiar de amplificação expresso em ΔRn (0,157).....	36
Figura 21 - Gel de amplificação em agarose 2%, originando sequências com 395 pb e bandas padrão com 100 pb.....	37
Figura 22 - Resultado das amplificações obtidas em teste qPCR na análise de caramujos infectados com <i>S. mansoni</i> (Inf-IMT), e caramujos controle negativos (CN_IMT).....	38
Figura 23 - Amplificação exponencial ilustrando o limiar de amplificação da qPCR de caramujos infectados com 30 miracídios de <i>S. mansoni</i> após 72 horas de infecção ($\Delta Rn \pm 0,43$).....	38
Figura 24 - Resultado das amplificações obtidas em teste qPCR na análise de caramujos infectados com <i>S. mansoni</i> (72h_30mir), e caramujos controle negativos (CN_72h).....	39
Figura 25 - Amplificação exponencial ilustrando o limiar de amplificação da qPCR de caramujos infectados com 30 miracídios de <i>S. mansoni</i> após 72 horas de infecção e ($\Delta Rn \pm 0,11$).....	39
Figura 26 - Percentual de amostras positivas por carga parasitária, com 72 horas de infecção na amplificação com a sequência de DNAm _t , gene COX 1.....	42
Figura 27 - Curva do percentual de amostras positivas por carga parasitária, com 14 dias de infecção na amplificação utilizando a sequência de DNAm _t , gene COX1.....	42
Figura 28 - Curva do percentual de amostras positivas por carga parasitária, com 72 horas de infecção na amplificação originando sequências em tandem com 121 pb.....	42
Figura 29 - Curva do percentual de amostras positivas por carga parasitária, com 14 dias de infecção na amplificação originando sequências em <i>tandem</i> com 121 pb.....	43
Figura 30 - Quadro com os achados anatomohistopatológicos dos grupos infectados por <i>S. mansoni</i> proveniente de caramujos e BH/IMT (G1) e Ourinhos (G2).....	47
Figura 31 - Granuloma hepático intersticial em fígado de hamster infectado com <i>S. mansoni</i> (BH), corado em HE e originado de <i>B. glabrata</i> Ourinhos (Christoni).....	48
Figura 32 - Granuloma pulmonar e pneumonite intersticial em pulmão de hamster infectado com <i>S. mansoni</i> (BH), corado em HE e originado de <i>B. glabrata</i> IMT.....	48
Figura 33 - Casal de verme adulto, com infiltrado leucocitário, encontrado no pulmão de hamsters infectados com cercárias do grupo controle positivo IMT após 43 dias de infecção cercária.....	49
Figura 34 - Algoritmo sugerido para aprimoramento dos procedimentos rotineiros na vigilância malacológica empregada para monitoramento de áreas de transmissão da esquistossomose mansoni.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Evolução temporal da investigação do genoma das espécies de <i>Schistosoma</i> spp. e descobrimento de métodos diagnósticos em material biológico humano.....	9
Tabela 2 - Cronograma de realização dos ensaios experimentais, utilizando diferentes sequências de iniciadores na padronização da detecção de caramujo <i>B. glabrata</i> exposto à diferentes cargas parasitárias de <i>S. mansoni</i>	25
Tabela 3 - Concentração de DNA de cinco amostras com 20 casais de <i>S. mansoni</i> em <i>pool</i>	32
Tabela 4 - Produto da amplificação obtido por TaqMan® qPCR. A positividade e quantidade de DNA obtido é expresso por meio da unidade Ct (Cycle Threshold), onde observou-se uma variação de (9,35 à 13,93) e média de 12,024 entre as cinco amostras analisadas.....	35
Tabela 5 - Produto da amplificação por qPCR TaqMan® de cinco amostras com 20 casais de <i>S. mansoni</i> em <i>pool</i> . Onde observou-se uma variação de (16,77 à 17,77) e média de 17,18 entre os Ct's das cinco amostras analisadas.....	36
Tabela 6 - Análise 72 horas e 14 dias após a exposição a crescentes cargas parasitárias (CP), ilustrando amostras positivas nos experimentos de cPCR em agrupamentos com 10 caramujos <i>B. glabrata</i> da linhagem Ourinhos (OU) e BH (IMT).....	40
Tabela 7 - Total de amostras positivas nas reações de com o gene COX1 do DNAm, 72 horas e 14 dias após exposição a crescentes cargas parasitárias (CP) de miracídeos de <i>S. mansoni</i>	41
Tabela 8 - Total de amostras positivas nas reações qPCR com marcador de repetição em <i>tandem</i> , 72 horas e 14 dias após exposição a crescentes cargas parasitárias (CP) de miracídeos de <i>S. mansoni</i>	41
Tabela 9 - Relação quantitativa entre os resultados obtidos com a utilização de diferentes técnicas de PCR na detecção de caramujos oriundos de Ourinhos após 72 horas da exposição experimental ao <i>S. mansoni</i> BH.....	44
Tabela 10 - Relação quantitativa entre os resultados obtidos com a utilização de diferentes técnicas de PCR na detecção de caramujos oriundos de Ourinhos após 14 dias da exposição experimental ao <i>S. mansoni</i> BH.....	44
Tabela 11 - Relação quantitativa entre os resultados obtidos com a utilização de diferentes técnicas de PCR na detecção de caramujos BH/IMT já adaptados ao ciclo após 72 horas da exposição experimental ao <i>S. mansoni</i> BH.....	45
Tabela 12 - Relação quantitativa entre os resultados obtidos com a utilização de diferentes técnicas de PCR na detecção de caramujos BH/IMT já adaptados ao ciclo após 14 dias da exposição experimental ao <i>S. mansoni</i> BH.....	45
Tabela 13 - Média de ovos encontrados por grama de fezes nas análises no Kato-Katz de hamsters infectados com <i>S. mansoni</i> originário de caramujos BH (G1) Ourinhos (G2) e controle negativo (G3), respectivamente.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

Δ	Diferença
μm	Micrometro
BH	Belo Horizonte
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CN	Controle Negativo
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
COX	Ciclo-oxigenase
cPCR	PCR convencional
Ct	Cycle threshold
CVE	Centro de Vigilância Epidemiológica
DNAmt	DNA mitocondrial
DNAr	DNA ribossomal
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EM	Esquistossomose Mansônica
HE	Hematoxilina-Eosina
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IMT	Instituto de Medicina Tropical
Inf	Infectado
IPC	Controle Positivo Interno
LAMP	Loop-Mediated Isothermal Amplification
LIM	Laboratórios de Investigação Médica
LS	Low Stringency
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OMS	Organização Mundial da Saúde
OU	Ourinhos
PCE	Programa de Controle da Esquistossomose
PCR	Polymerase Chain Reaction
SSP	Sequence-Specific Primers
PISF	Projeto de Integração do Rio São Francisco
qPCR	PCR em Tempo Real
SINAN	Sistema de Avaliação de Agravos de Notificação
SJ	São José dos Campos
SM	Schistosoma mansoni
SUCEN	Superintendência de Controle de Endemias
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 A tecnologia molecular no diagnóstico de <i>S. mansoni</i>	7
2.2 Morfologia do <i>Biomphalaria</i>	10
2.3 Epidemiologia da esquistossomose mansoni no Estado de São Paulo.....	11
2.4 Detecção de moluscos infectados com <i>S. mansoni</i>	12
3 JUSTIFICATIVA.....	14
4 OBJETIVO GERAL.....	15
4.1 Objetivos secundários.....	15
5 METODOLOGIA.....	16
5.1 Aspectos Éticos.....	16
5.2 Desenho de estudo.....	16
5.3 Local de estudo e população de caramujos.....	17
5.4 Coleta, transporte e identificação dos caramujos <i>B. glabrata</i>	18
5.5 Manutenção dos caramujos <i>B. glabrata</i>	19
5.6 Obtenção de miracídios da cepa <i>S. mansoni</i> (BH) para exposição experimental dos moluscos.....	20
5.7 Exposição experimental de moluscos <i>B. glabrata</i> linhagens Ourinhos e BH/IMT a miracídios de <i>S. mansoni</i> (BH).....	21
5.8 Obtenção de <i>pool</i> com 20 casais de vermes adultos para a padronização dos ensaios de PCR.....	24
5.9 Extração do DNA de <i>S. mansoni</i>	25
5.10 Seleção de <i>primers</i> e sonda para amplificação do genoma de <i>S. mansoni</i>	25
5.11 Detecção do DNA de <i>S. mansoni</i> por PCR.....	26
5.12 PCR convencional (cPCR).....	26
5.13 TaqMan® qPCR.....	27
5.14 Avaliação do potencial de infecciosidade das cercárias liberadas pelos caramujos coletados em Ourinhos/SP.....	27
5.15 Avaliação do comportamento da infecção experimental por <i>S. mansoni</i> cepa BH em <i>B. glabrata</i> linhagem Ourinhos.....	28
6 RESULTADOS.....	31
6.1 Desenvolvimento da linhagem laboratorial de <i>B. glabrata</i> de Ourinhos.....	31

6.2 Extração de DNA em <i>pool</i> com 20 casais de vermes adultos de <i>S. mansoni</i> em cinco amostras.....	31
6.3 cPCR resultante de cinco amostras contendo 20 casais de vermes adultos de <i>S. mansoni</i> em <i>pool</i>	32
6.4 TaqMan® qPCR's resultantes de cinco amostras contendo 20 casais de vermes adultos de <i>S. mansoni</i> em <i>pool</i>	34
6.5 Ensaio da especificidade para o material genético de <i>S. mansoni</i> intra-molusco.....	36
6.6 Diagnóstico molecular da infecção de caramujos <i>B. glabrata</i> linhagem Ourinhos e BH/IMT.....	40
6.7 Avaliação parasitológica.....	45
6.8 Histopatologia de hamsters infectados com <i>S. mansoni</i> provenientes das cercárias de caramujos Ourinhos e BH.....	46
7 DISCUSSÃO.....	50
8 CONCLUSÕES.....	57
9 PROPOSTA.....	58
REFERÊNCIAS.....	59
APÊNDICES.....	66
ATIVIDADES ACADÊMICAS.....	78
TRABALHOS CIENTÍFICOS.....	82

1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose mansoni (EM) é uma infecção parasitária, que representa um grave problema de saúde pública, pois é observada em mais de 74 países, cursando com prevalência mundial estimada em 240 milhões de indivíduos infectados (WHO, 2016).

Na América Latina e Central a doença está presente no Brasil, Venezuela, Porto Rico, Antilhas e Suriname (Menezes; Carmo; Samico, 2012). No território nacional, o Ministério da Saúde estima uma prevalência média de sete milhões de indivíduos infectados, estando a maior parte dos casos de EM concentrados nos estados do Nordeste (Brasil, 2013).

O trematódeo *Schistosoma mansoni* (SM), agente causador dessa doença, foi descrito primeiramente em 1907, pelo inglês Sambon. A forma mais grave da EM apresenta altos índices de morbidade e mortalidade, onde a eliminação dessa helmintose só será possível por meio de medidas que interrompam o ciclo de desenvolvimento desse parasito (Katz e Almeida, 2003; Rey, 2002).

Por essa razão, em 2012, na última Assembléia Mundial da Saúde, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceu metas onde, até 2020 para zonas de baixa endemicidade, deveriam ser desenvolvidos processos visando o controle da morbidade e erradicação naqueles locais que dispõe de recursos. Juntamente, a eliminação foi tratada como uma questão de saúde pública (King, 2017; Toor et al., 2018).

O ciclo do SM é complexo e constituído de uma fase assexuada no interior do molusco hospedeiro intermediário, e uma sexuada que terá seu fechamento no hospedeiro definitivo. Assim, a parasitemia se inicia quando as fezes do indivíduo infectado contendo ovos de SM são eliminados em coleções hídricas (Figura 1).

Os ovos, quando entram em contato com a água, eclodem originando o miracídio, o qual constitui no primeiro estágio de vida livre do SM, o qual infectará um caramujo do gênero *Biomphalaria*. O miracídio possui formato oval, é revestido por numerosos cílios e mede de 150-170 µm de comprimento por 60-70 µm de largura (Katz e Almeida, 2003). A atração ao caramujo ocorre devido aos quimiorreceptores localizados nas fibras conectadas às células nervosas do parasito. Esses quimiorreceptores são capazes de perceber substâncias do muco produzidas no molusco, possibilitando o encontro de ambos (Carvalho; Coelho; Lenzi, 2008). Hassan et al. (2003) constataram que o movimento das larvas

aumenta quando colocadas em água previamente condicionada pela presença de *B. glabrata*.

Figura 1 - Ciclo biológico de *S. mansoni*

Fonte: modificado de CDC <https://www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/biology.htm>

Cerca de quarenta e oito horas após a penetração no caramujo, os miracídeos perdem algumas estruturas (glândulas de adesão e penetração, epitélio ciliado, sistema nervoso entre outros). Essa perda acarreta na formação de sacos cuticulares com células germinativas que estão em constante multiplicação, muitas vezes dobrando seu tamanho. Esta estrutura é denominada esporocisto primário, esporocistos mãe ou, simplesmente, esporocisto I (Guaraldo et al., 1981; Carvalho; Coelho; Lenzi, 2008).

O local de penetração pode ser representado por qualquer ponto das partes expostas do caramujo, porém, a massa cefalopodal, principalmente a base das antenas e o pé, são pontos preferidos (Carvalho; Coelho; Lenzi, 2008).

Após 72 horas, o esporocisto I dobra de tamanho, e em 14 dias decorridos após a penetração do miracídio, se iniciará a formação do esporocisto secundário, ou esporocisto II. Esta diferenciação ocorre no interior de ramificações tubulares, que se formaram preenchendo todos os espaços intercelulares no interior do esporocisto I.

Após o 18º dia, esses sacos cuticulares se rompem liberando os esporocistos II, que migrarão até a glândula digestiva e demais tecidos onde ocorrerá a formação da cercária no interior do molusco (Barbosa, 1995; Carvalho; Coelho; Lenzi, 2008).

Em condições adequadas de temperatura, luz e calor, no contato do caramujo com coleções hídricas, ocorrerá a liberação da cercária, sendo esta o último estágio de vida livre de *S. mansoni*, fechando assim o ciclo assexuado do parasito e dando início à fase sexuada, que ocorrerá após a penetração da cercária no corpo do hospedeiro definitivo que deve ser um mamífero vertebrado.

Neste evento, a cercária perde a cauda e perfaz um percurso inicialmente extravascular, posteriormente caindo na circulação sistêmica e mudando aspectos de sua morfologia. Ao cair na circulação sistêmica, o parasita passará pelos pulmões, onde migrará para o sistema porta-hepático e chegará ao fígado na forma adulta e com sexagem já estabelecida (Espírito-Santo, 2013; Carvalho; Coelho; Lenzi, 2008).

A perpetuação do ciclo ocorrerá com a migração dos vermes adultos ao intestino, onde terá início o acasalamento de machos e fêmeas, caracterizando o início do processo de oviposição na luz intestinal eliminando os ovos juntamente com as fezes do indivíduo infectado (Watson et al., 1960; Brasil, 2008; Carvalho; Coelho; Lenzi, 2008; Espírito-Santo et al., 2012, 2014; Palasio et al., 2019).

A esquistossomose aguda quanto à patologia, se apresenta pela presença de superestimulação do sistema imune, e processo inflamatório gerando numerosos granulomas periovulares no fígado, intestinos e pulmões. Na fase crônica, estes granulomas periovulares se formam nas ramificações da veia porta, caracterizando hepatoesplenomegalia com evolução para posterior fibrose hepática periportal, podendo levar à formação de circulação colateral e inclusive ao óbito do indivíduo acometido (Carvalho; Coelho; Lenzi, 2008; Espírito-Santo et al., 2014).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Em um estudo, Guaraldo et al. (1981) relatou a existência de um estímulo que induz a diferenciação do esporocisto primário para o secundário, sendo fundamental a chegada ao hepatopâncreas ou ovotestis, pois, somente nestas regiões é que se encontraram esporocistos secundários maduros e com cercárias bem diferenciadas.

Além de fatores quimiotáticos, também há características intrínsecas ao molusco que tornam a infecção do parasito mais propícia. Das espécies hospedeiras naturais de *S. mansoni*, a *B. glabrata* é considerada a com maior probabilidade de completar o ciclo do parasita. A susceptibilidade entre *B. tenagophila* e *B. glabrata* com linhagens BH de *S. mansoni* foi comparada e verificou-se que cerca de 40% das *B. glabrata* estavam infectadas, em vista de somente 6,6% de *B. tenagophila* liberaram cercárias (Santana; Magalhães; Rangel, 1978). Este fato se repetiu nas gerações seguintes destes caramujos, caracterizando a *B. glabrata* como a espécie hospedeira intermediária natural de SM mais adaptada e provável de perpetuar o ciclo da parasitemia (Guaraldo et al., 1981).

Em outro estudo, analisou-se as reações amebocitárias em *B. glabrata* de Belo Horizonte (BH) e em *B. tenagophila* de São José dos Campos (SJ) expostas ao *S. mansoni* das linhagens BH e SJ, respectivamente (Guaraldo et al., 1981). Foi verificado que na linhagem SJ houve um grande número de esporocistos degenerados, enquanto que, na primeira espécie predominavam esporocistos viáveis.

Em estudo recente usando análises baseadas em modelos matemáticos que visam a investigação da viabilidade das estratégias de controle da esquistossomose, que tem como propósito contemplar as metas atuais da Organização Mundial de Saúde (OMS) menciona que esta relação depende principalmente da configuração das áreas de transmissão. Isto é, em regiões de baixa prevalência, há alta probabilidade de alcançar os objetivos, entretanto, em regiões de prevalência moderada à alta, adaptações programáticas e modificações das diretrizes atuais são necessárias para atingir as metas (Toor et al., 2018).

Níveis mais amplos e abrangentes de cobertura de um tratamento epidemiológico por faixa etária aumentarão a probabilidade de cumprir com os objetivos, podendo trazer à tona discussões sobre o futuro da esquistossomose (Toor et al., 2018).

As áreas de transmissão autóctone da EM no estado de São Paulo estão localizadas no Vale do Ribeira, Vale do Paraíba, Litoral Norte, Baixada Santista, Grande Campinas e alguns municípios da Região Metropolitana de São Paulo, incluindo a capital (Brasil, 2008) onde a espécie *B. tenagophila* é predominante (Carvalho; Coelho; Lenzi, 2008). A única exceção está relacionada com os casos procedentes dos criadouros naturais de *B. glabrata*, restritos a coleções de água no trecho médio do Rio Paranapanema (Figura 2) onde a espécie coloniza inúmeras coleções hídricas (Palasio et al., 2019).

Figura 2 - Mapa modificado da distribuição das bacias hidrográficas do Estado de São Paulo com destaque ao trecho médio do Paranapanema

Fonte: Sistema Integrado de Gerenciamento de Recursos Hídricos.

[\[http://www.sigrh.sp.gov.br/cbhmp/apresentacao\]](http://www.sigrh.sp.gov.br/cbhmp/apresentacao)

O processo de industrialização e desenvolvimento agrícola atrelado à visão comercial capitalista acarretaram em processos como o êxodo-rural, produzindo muitas vezes uma ocupação desordenada de terras. De maneira geral, estes eventos estão relacionados ao rápido processo de urbanização desencadeado na região sudeste, principalmente na segunda metade do século XX, tornando-se um

desafio o estabelecimento de uma relação sustentável entre sociedade e natureza (Laurenti & Piroli, 2012).

No que diz respeito à Ourinhos, a ocupação urbana gerou impactos ambientais duradouros sobre os sistemas hídricos da paisagem, sendo estes todos pertencentes às microbacias afluentes dos Rios Pardo e Paranapanema (Figura 3).

Figura 3 - Mapa de localização da área de estudo no município de Ourinhos/SP

Fonte: Laurenti & Piroli (2012).

As cinco referidas microbacias tem como canal principal os córregos, Águas das Furnas, Christoni e Veada que deságuam no rio Pardo e os córregos Águas do Jacu, Monjolinho e Chumbeadinha, que deságuam no rio Paranapanema (Figura 4). Todos os córregos apresentados possuem suas áreas de cabeceiras ocupadas por atividades humanas, sejam elas, industriais, comerciais ou residenciais. O que importa nessa observação é o fato de estarmos tratando do sistema hídrico (nascentes, córregos, reservatórios), seja em micro ou macro escala. As ações humanas irão refletir inevitavelmente em todo o sistema (Laurenti & Piroli 2012).

Figura 4 - Mapa de localização das microbacias hidrográficas no perímetro urbano de Ourinhos/SP

Fonte: Laurenti & Piroli (2012).

Neste contexto, Palasio et al. (2019) estudaram a distribuição e identificação de espécies no Estado de São Paulo, apontando a presença de *B. glabrata* neste município, estando estes localizados no córrego Christoni. Em Ourinhos também foram registrados um total de 16 casos autóctones de esquistossomose no período de 2008 a 2010, de acordo com o CVE (Centro de Vigilância Epidemiológica, SP, Brasil).

A definição da *B. glabrata* como o hospedeiro intermediário mais adaptado ao ciclo de *S. mansoni*, associado ao potencial reprodutivo da espécie são dados que tornam esse local interessante quando se deseja estudar a possibilidade de infecção por cepas de miracídeos importados, o que poderia representar um risco para essa região aumentar sua endemicidade, uma vez que se trata de um município em que se inserem atividades agrícolas e processos migratórios (Laurenti & Piroli, 2012).

2.1 A tecnologia molecular no diagnóstico de *S. mansoni*

O método diagnóstico mais utilizado na rotina laboratorial é a detecção de ovos de *S. mansoni* nas fezes, no entanto, ao longo dos anos, foram feitas diversas modificações no diagnóstico com os detritos fecais, uma vez que, caso o indivíduo possuísse uma carga parasitária muito baixa, dificultaria a visualização dos ovos pelo exame das fezes (WHO, 2009; Teixeira, 2011). Diante desse fato, os ensaios

imunológicos e de biologia molecular representam uma alternativa para o diagnóstico da infecção humana com o *S. mansoni* (Teixeira, 2011).

As técnicas de biologia molecular representam uma importante ferramenta para o diagnóstico de diversos patógenos, devido à sua alta sensibilidade e a capacidade de diferenciar as espécies do mesmo gênero. A PCR (Reação em Cadeia da Polimerase - do inglês "*Polymerase Chain Reaction*") identificou *S. mansoni* em amostras de fezes e urina humanos e em caramujos infectados (Steinauer; Blouin; Criscione, 2010). Além disso, marcadores genéticos, como microssatélites e DNA mitocondrial vêm sendo usados como uma ferramenta de investigação em frequências de migração populacional (Durand; Sire; Théron, 2000).

A Tabela 1 apresenta uma síntese dos trabalhos desenvolvidos por meio de marcadores moleculares com o objetivo de aprimorar o diagnóstico de espécies de *Schistosoma mansoni* e *Schistosoma haematobium* nos hospedeiros definitivos e intermediários.

Tabela 1 - Evolução temporal da investigação do genoma das espécies de *Schistosoma* spp. e descobrimento de métodos diagnósticos em material biológico humano

Arquivo/Ano	Tema	Técnica (marcador utilizado)	Objetivo
Le; Blair e McManus, 2000	Projeto genoma <i>Schistosoma</i>	Sequenciamento de DNA mitocondrial	Genotipagem do DNA mitocondrial de <i>Schistosoma</i> spp.
Hamburger et al., 1991	Reconhecimento de sequências repetidas de <i>S. mansoni</i> com probe espécie específica	Clonagem de DNA mitocondrial	Vigilância ambiental
Jannotti-Passos et al., 1997	Identificação de <i>S. mansoni</i> em <i>B. glabrata</i>	LS-PCR ¹ Multiplex PCR	Vigilância epidemiológica
Pontes; Dias-Neto e Rabellos, 2002	Identificação de <i>S. mansoni</i> em amostras fecais e soro humano	PCR convencional	Aprimoramento de diagnóstico
Sandoval et al., 2006 (b)	Identificação de <i>Schistosoma</i> spp. em amostra de urina humana	PCR-SSP ²	Aprimoramento de diagnóstico
ten Hove et al., 2008	Deteção da carga parasitária de <i>S. mansoni</i> e <i>S. haematobium</i> em amostras fecais	PCR Real Time PCR multiplex	Vigilância epidemiológica
Gomes et al., 2009	Identificação de ovos de <i>Schistosoma</i> spp. em amostra de fezes humanas	PCR convencional	Aprimoramento de diagnóstico
Wichmann et al., 2009	Análise da presença de <i>S. mansoni</i> em plasma humano	PCR convencional PCR Real Time	Investigação da carga parasitária
Enk; Oliveira e Rodrigues, 2010	Análise de método de extração de DNA de <i>S. mansoni</i> em urina infectada artificialmente	PCR convencional	Aprimoramento de diagnóstico

Fonte: Arquivo Pessoal (2019).

LS-PCR¹ (*Low stringency polymerase chain reaction*); PCR-SSP² (*sequence-specific primers*).

2.2 Morfologia do *Biomphalaria*

Os caramujos do gênero *Biomphalaria* apresentam uma concha planispiral, com diâmetro variando nos indivíduos adultos entre sete milímetros (mm) a 40 mm.

A cor natural da concha é amarelo-palha, mas modifica-se em contato com substâncias corantes dissolvidas na água dos criadouros, como o óxido de ferro, que confere às conchas coloração mais escura, passando por vários tons de marrom até o negro.

No caso da *B. glabrata*, conforme demonstrado na Figura 5, a diferenciação e a determinação da espécie podem ser feitas facilmente ao observar a presença de uma crista renal no interior do manto, visualizada na secção longitudinal do molusco (Paraense, 1975).

Figura 5 - Morfologia do *B. glabrata*

Fonte: Paraense, 1975.

A) Desenho da 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: canal coletor do ovotestis (cc), encruzilhada genital (eg), ovispermiduto proximal (odp), ovispermiduto distal (odd), ovotestis (ot) e vesícula seminal (vs); estruturas masculinas: bainha do pênis (bp), canal deferente (cd), espermiduto (ed), músculos do complexo peniano [retrator (mr) e protrator (mp)], prepúcio (pp) e próstata (pr); estruturas femininas: bolsa do oviduto (bo), bolsa vaginal (bv), espermateca (es), glândula nidamental (gn), oviduto (ov), vagina (va) e útero (ut); coração (co), pericárdio (pe), glândula de albúmen (ga), veia pulmonar (vp), veia renal (vr), tubo renal (tr), crista lateral (cl), crista renal (cr), linha renal pigmentada (lr), colar do manto (cm), ureter (ur), meato do ureter (mu) e pneumóstoma (pn).

Esses animais são hermafroditas, predominando a fecundação cruzada sobre a autofecundação, a qual, ocorre somente quando isolados. Paraense (1975) demonstrou que um único exemplar de *B. glabrata* pode produzir 10 milhões de descendentes em três meses. Entretanto, a fecundação cruzada prevalece em condições naturais, devido à maior variabilidade genética observada na reprodução dos descendentes conferindo melhores características adaptativas.

2.3 Epidemiologia da esquistossomose mansoni no Estado de São Paulo

A introdução da esquistossomose no Brasil foi consequência da exploração da força de trabalho que caracterizou a expansão do capitalismo mercantil em Portugal, de forma escravista, amplamente empregado nas colônias ultramarinas (Chieffi e Waldman, 1988).

A disseminação dessa endemia pelo território brasileiro teve como determinante a forma como se processou a acumulação de riquezas, nas diferentes áreas, condicionando um desenvolvimento desigual da economia (Chieffi e Waldman, 1988).

Freitas (1972) reporta fatores importantes para a expansão da esquistossomose em território nacional, tais como: a existência de correntes migratórias originárias de focos hiperendêmicos, a existência de hospedeiros intermediários suscetíveis em extensas áreas do país e a deficiência do controle sanitário.

Em 1952, Ferreira e Meira descrevem os primeiros casos autóctones distantes do litoral (do Estado de São Paulo) e localizados nos municípios de Ourinhos, Ipaçu e Palmital.

A presença de *B. glabrata* em Ourinhos torna esta área um ponto chave para o desenvolvimento de estudos que aprimorem as medidas de controle na vigilância de áreas endêmicas, as quais, agregadas à características geográficas favoráveis, podem constituir um risco no aumento da transmissão e endemicidade local (Palasio et al., 2019).

Historicamente, Magalhães e Dias (1973) estudaram a suscetibilidade da *B. glabrata* de um foco de EM no município de Ourinhos, induzindo a eliminação de cercárias por meio da exposição dos caramujos à luz. Com isso, observaram uma alta afinidade desses moluscos a infecções pelas linhagens BH e SJ de *S. mansoni*.

Entretanto a ação de determinados componentes metabólicos liberados pelas cercárias, associado à compressão dos tecidos pelos parasitos e a formação de êmbolos na hemolinfa são fatores culminantes para a mortalidade precoce do hospedeiro intermediário, dificultando a vigilância dessa parasitose, e a avaliação dessa susceptibilidade nos trabalhos de campo (Carvalho; Coelho; Lenzi, 2008; Barbosa, 1995).

2.4 Detecção de moluscos infectados com *S. mansoni*

O diagnóstico convencional da infecção por *S. mansoni* em *Biomphalaria* é feito rotineiramente também pela exposição dos moluscos à luz artificial e identificação das cercárias (Carvalho; Coelho; Lenzi, 2008; Caldeira; Jannotti-Passos; Santos Carvalho, 2017). Pode ainda ser utilizado o esmagamento dos moluscos entre placas de vidro. Neste último caso, além das cercárias, pode-se também observar a presença de esporocistos, principalmente se estes estiverem na glândula digestiva.

Em contrapartida, quando os esporocistos são imaturos e localizados na região do cefalópodeo, inviabiliza-se o diagnóstico com este método empregado na rotina. Outro empecilho encontrado para o diagnóstico da infecção em moluscos coletados no campo, é a distância do local de coleta até o laboratório de diagnóstico, o que pode acarretar a morte de muitos exemplares durante o transporte. Em decorrência disto, vêm sendo atualmente estudado o emprego de técnicas moleculares, afim de auxiliar o diagnóstico de moluscos infectados (Carvalho; Coelho; Lenzi, 2008; Caldeira; Jannotti-Passos; Santos Carvalho, 2017).

Graças ao advento da PCR foi possível obter um avanço no diagnóstico da infecção pré-patente em *B. glabrata*. De fato, utilizando a *nested* PCR foi possível detectar a presença de *S. mansoni* em *B. glabrata* e diferenciar de outros trematódeos (Hanelt et al., 1997). Porém, esta técnica tem como desvantagem a falta de um controle interno da reação, além da possibilidade de contaminação, uma vez que, se trata de duas reações sequenciais de PCR que amplificam pares de iniciadores específicos para a região 18S do DNAr de *S. mansoni*.

Uma outra abordagem da PCR, a multiplex-PCR, foi estudada também para o diagnóstico da infecção em *B. glabrata* (Janotti-Passos et al., 1997, 2006), com ela foi possível detectar a infecção no período pré-patente inclusive em moluscos mortos há 24 horas, bem como, diferenciar *S. mansoni* de dois outros trematódeos

(*C. caratinguensis* e *C. macrogranulosa*) (Janotti-Passos et al., 1997; Caldeira; Jannotti-Passos; Santos Carvalho, 2017).

Mais recentemente o advento da LAMP-PCR possibilitou também uma investigação visando facilitar o método de detecção do molusco infectado, neste último caso, por meio de uma técnica em que não é necessário a utilização de termociclador (Abbasi et al., 2010; Gandasegui et al., 2016; 2018; Caldeira; Jannotti-Passos; Santos Carvalho, 2017).

Por fim, a implantação da biologia molecular possibilitou, entre outros, a geração de novos conhecimentos sobre a sistemática e genética de populações dos moluscos, os quais, sabe-se que possuem papel crucial na transmissão da esquistossomose humana. Como consequência, enquanto que em *S. mansoni*, observa-se que o polimorfismo genético é limitado, em *B. glabrata* é muito pronunciado. Isto sugere que a genética do hospedeiro intermediário pode desempenhar papel muito mais importante na determinação da epidemiologia da doença do que do próprio parasita (Simpson et al., 1995; Theron et al., 2014; Carvalho; Coelho; Lenzi, 2008).

3 JUSTIFICATIVA

No município de Ourinhos, SP, Brasil, foram registrados um total de 16 casos autóctones de EM no período de 2008 a 2010, de acordo com o Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE). Esses dados fazem com que a região tenha potencial para se transformar em uma área de maior endemidade considerando-se: a presença de *B. glabrata* como hospedeiro intermediário mais suscetível à infecção pelo *S. mansoni*; a possibilidade de processos migratórios populacionais; as atividades laborais, culturais e de lazer locais e as condições geográficas e ambientais. Esses fatores favorecem não só a introdução de cepas importadas do parasito, como também, o aumento da incidência dos casos autóctones.

Dessa forma, esse estudo pretende aprimorar o diagnóstico no hospedeiro intermediário por meio das técnicas moleculares na fase pré-patente da infecção. Diante disso, também se considerou importante avaliar a possibilidade de infecção do hospedeiro definitivo por meio da inoculação das cercárias diferenciadas dentro de uma nova linhagem laboratorial de caramujos (Ourinhos, SP).

A infecção do parasito que se desenvolve durante a fase pré-patente da infecção no hospedeiro intermediário pode ser verificada pela detecção das formas parasitárias intra-moluscos. Dessa forma, propomos padronizar a identificação molecular do DNA genômico parasitário em *B. glabrata* infectado experimentalmente (Caldeira; Jannotti-Passos; Santos Carvalho, 2017).

Trata-se de uma pesquisa relevante para os trabalhos referentes ao aprimoramento da vigilância da EM, contribuindo com estudos que corroborem com as diretrizes estabelecidas para o controle da esquistossomose nos próximos anos (WHO, 2016). Sabe-se que a detecção de moluscos positivos é tarefa difícil em regiões de média e alta endemidade, a dificuldade aumenta ainda mais em situação de baixa endemidade, as quais tornam muito mais árdua a procura de focos de infecção, uma vez que uma baixa carga parasitária não impede a infecção humana (Carvalho; Coelho; Lenzi, 2008).

Diante destes fatos, e por todas as características descritas previamente, decidiu-se eleger o município de Ourinhos como principal alvo no estudo, uma vez que, negligências na vigilância de áreas em potencial para perpetuação desta parasitemia podem impactar no desenvolvimento humano, urbano e na qualidade de vida das populações locais, sendo também um contraponto à emenda proposta na última Assembléia Mundial de Saúde.

4 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e padronizar técnicas moleculares sensíveis e específicas para detectar a infecção por *S. mansoni* em caramujos *B. glabrata* procedentes de área de baixa endemicidade.

4.1 Objetivos secundários:

- a) desenvolver e estabelecer o ciclo experimental da infecção por *S. mansoni* em linhagem de caramujos *B. glabrata* coletada do município de Ourinhos, bairro Christoni;
- b) avaliar o grau de infecciosidade das cercárias liberadas pelos caramujos coletados no bairro Christoni (Ourinhos, São Paulo, SP);
- c) padronizar a detecção de esporocistos primários de *S. mansoni* por PCR em *B. glabrata* (linhagem BH) experimentalmente infectado;
- d) comparar a sensibilidade da PCR para detecção de esporocistos primários de *S. mansoni* em *B. glabrata* após 72 horas e 14 dias da infecção experimental com diferentes cargas parasitárias (5, 10, 20 e 30 miracídios) em *B. glabrata* (BH) já existente no ciclo rotineiro do laboratório, com as recentemente introduzidas (Ourinhos, SP).

5 METODOLOGIA

5.1 Aspectos Éticos

O presente projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética e Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Projeto Número 1012/2018) e ao Comitê de Ética e Pesquisa envolvendo Animais, do Instituto de Medicina Tropical (Projeto Número 000354), de acordo com as normas, que cumprem as Leis (6.638/79 e 9605/98), o Decreto 24.645/34, os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA) (Genebra, 1985) e outras instruções que regulamentam pesquisas com animais.

5.2 Desenho de estudo

Trata-se de um estudo experimental realizado em caramujos *B. glabrata* originários do bairro Christoni, no município de Ourinhos, Vale do Paranapanema, São Paulo, Brasil, coletados entre os meses de dezembro de 2015 e março de 2016 pela Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN) obedecendo instruções estabelecidas (Brasil, 2008). Após a coleta, estes animais foram transportados ao setor de Imunopatologia da Esquistossomose, Laboratório de Investigação Médica-06 (LIM-06) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, onde o estudo se desenvolveu.

Estabeleceu-se a criação de caramujos *B. glabrata* e o desenvolvimento do ciclo experimental de *S. mansoni*, assim designada linhagem Ourinhos. Desta forma, duas fases do estudo foram realizadas a partir do estabelecimento do ciclo experimental (Figura 6).

Figura 6 - Desenho do estudo para avaliação de caramujos *B. glabrata* de Ourinhos infectados experimentalmente com miracídeos de *S. mansoni* linhagem BH

Fonte: Arquivo Pessoal (2019).

5.3 Local de estudo e população de caramujos

De acordo com dados do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), estima-se que a população de Ourinhos para 2018 é de 112.711 pessoas, um crescimento de 0,8% em relação à estimativa realizada em 2017 e de 9,7% comparado com os números do último censo oficial de 2010, quando a população era de 103.000 pessoas.

Ourinhos aparece na 73ª posição entre os 645 municípios do Estado de São Paulo e figura entre as 300 maiores cidades do Brasil, que conta com 5.570 unidades federativas (Fonte: <https://www.ourinhos.sp.gov.br/noticia/4601/populacao-de-ourinhos-chega-a-quase-113-mil-habitantes-em-2018-diz-ibge/>).

Palasio et al. (2019) confirmaram a presença de *B. glabrata* nesse município, bem como a presença de casos autóctones no período de 2008 a 2010 registrados pelo Centro de Vigilância Epidemiológica, SP (CVE).

Selecionou-se o bairro Christoni, região da bacia do trecho médio do rio Paranapanema por possuir a presença de *B. glabrata* e atividades laborais no perímetro do córrego. Além desse aspecto, dados retirados do SINAN (Sistema de Avaliação de Agravos de Notificação), no período de 1983-1999, apontaram aumento da prevalência local dessa parasitose.

5.4 Coleta, transporte e identificação dos caramujos *B. glabrata*

O material necessário para a coleta foi constituído por: pinças longas, conchas de captura, recipientes plásticos para acondicionar os moluscos, luvas, botas de borracha, fichas de coleta, canetas e etiquetas para identificação do material coletado.

Durante a coleta, raspou-se com a concha, o fundo e as margens do criadouro e a vegetação, lavou-se o material com cuidado e observou-se se algum molusco foi retirado. Após a coleta, os moluscos foram examinados quanto à presença de algum tipo de infecção cercariana. Para isso, foram separados individualmente em microrrecipientes de vidro contendo 1/3 de água filtrada e identificados com a data e nome do local de coleta. Os frascos foram expostos sob o foco de uma luz incandescente de 60 watts (Carvalho; Coelho; Lenzi, 2008).

Em seguida, retirou-se 1 ml da água presente em cada frasco, e analisou-se individualmente seu conteúdo em lupa (5x) afim de verificar a presença de algum tipo de cercária.

Posteriormente, os exemplares de *B. glabrata* livres de infecção foram separados para posterior envio ao laboratório (Figura 7) e início na obtenção da linhagem Ourinhos.

Figura 7 - Transporte de caramujos coletados do campo, embebidos em gaze umedecida com água, para o laboratório conforme normas estabelecidas pelo Ministério da Saúde

Fonte: Brasil, 2008.

5.5 Manutenção dos caramujos *B. glabrata*

É importante considerar que já existe a manutenção de um ciclo experimental rotineiro no Laboratório de Imunopatologia da Esquistossomose da Universidade de São Paulo (LIM-06), onde é mantida a linhagem BH de *B. glabrata*. Assim, no desenvolvimento da linhagem Ourinhos foram estabelecidas as mesmas condições ambientais e nutricionais dos moluscos BH/IMT já adaptados às condições experimentais.

Os caramujos depositavam suas desovas em pequenas placas de isopor quadrangulares. Essas desovas contidas nas placas foram retiradas semanalmente e separadas em outro aquário.

A manipulação da criação é um fator importante, pois pode interferir diretamente no ritmo de crescimento. Assim, uma vez por semana, a água dos recipientes foi trocada, os aquários lavados com água não clorada e os animais redistribuídos em novos aquários, procurando-se manter a mesma proporção de água por molusco. A alimentação da criação ocorreu duas vezes por semana, com ração de hamster (*Mesocricetus auratus*) triturada, acrescida de carbonato de cálcio. Os moluscos também se alimentavam do perifíton (algas e cianofíceas) formado no fundo dos recipientes.

5.6 Obtenção de miracídios da cepa *S. mansoni* (BH) para exposição experimental dos moluscos

Os miracídios que foram utilizados para o experimento de exposição dos caramujos *B. glabrata* coletados em Ourinhos foram obtidos do ciclo experimental já mantido rotineiramente no Laboratório de Imunopatologia da Esquistossomose da Universidade de São Paulo (LIM-06), onde são realizadas exposições periódicas dos moluscos *B. glabrata* (BH) à esta cepa de *S. mansoni* (Projeto regulamentado pelo Número 000354). Os caramujos que estão eliminando cercárias são reunidos em recipiente contendo água decolorada por um período de 60 minutos, e expostos ao foco de lâmpada halogênio 60 watts. Todo o volume da suspensão é colocado em tubo de 13x150 mm, onde as cercárias são concentradas por fototropismo. Ao final do processo, uma alíquota de 0,5 mL da solução é retirada para quantificação destas formas larvárias. A contagem das cercárias é realizada em placa de Kline (Perfécsta Cód. 300, São Paulo, Brasil) de 6x8 cm, distribuindo a referida alíquota em volumes 0,1 mL para cada escavação. Após, coloca-se uma gota de lugol por escavação e procedem-se as contagens. O inóculo é estimado a partir do número médio de cercárias em 0,5 mL da solução original.

Posteriormente, os hamsters são infectados por via subcutânea com cerca de 200 a 300 cercárias de *S. mansoni* (linhagem BH) e sacrificados após 49 a 56 dias de infecção para obtenção de vermes adultos e ovos do parasita. Os fígados contendo granulomas são utilizados como fonte de ovos para a produção de miracídios. As vísceras são cortadas em pequenos fragmentos e homogeneizadas em liquidificador com 80 mL de solução salina 0,85%. Em seguida a suspensão é filtrada em tela de amianto (Tecmolin Ltda., PA-6-2-212/XX, São Paulo, Brasil) para a retirada dos debris celulares e depositadas em cálice de sedimentação por uma hora. Retiram-se dois (2) mL do precipitado contido no cálice de sedimentação e adiciona-se à uma placa de Petri (Prolab, São Paulo, Brasil) contendo 100 mL de água filtrada, essa diluição é colocada sob um foco de luz com lâmpada halogênio de 60 watts para que ocorra eclosão dos miracídios. Ao final os miracídios são observados com auxílio de uma lupa, onde 1 mL do conteúdo é distribuído numa placa de Kline (Perfécsta Cód. 300, São Paulo, SP), retornando-se ao início do ciclo experimental.

5.7 Exposição experimental de moluscos *B. glabrata* linhagens Ourinhos e BH/IMT a miracídios de *S. mansoni* (BH)

Os caramujos das linhagens Ourinhos e BH foram separados individualmente em vinte frascos de vidro de 50 mL, contendo um caramujo por frasco. Em cada recipiente, adicionou-se aproximadamente 30 mL de água filtrada.

Colocou-se a placa de Kline a qual continha os miracídios (item 5.6) sob a lupa e com uma pipeta Pasteur de vidro, os miracídios foram coletados, contados e adicionados aos frascos individuais os quais continham os caramujos.

Expôs-se os frascos sob o foco de luz durante 24 horas para ocorrer a infecção. Em seguida, os moluscos foram colocados em aquário separado ao abrigo da luz, e identificados conforme a linhagem, data da exposição e sacrifício.

O primeiro passo para avaliar a especificidade dos métodos de PCR foi a análise dos cefalópodeos de dois grupos de caramujos *B. glabrata* linhagem BH, contendo 10 caramujos cada: Grupo 1 - caramujos experimentalmente infectados com 30 miracídios; Grupo 2 - caramujos sem infecção ou controle negativo para infecção. Esses animais foram submetidos a dissecação dos cefalópodeos 72 horas pós infecção do Grupo 1.

O segundo passo para avaliar a sensibilidade dos métodos de PCR foi a análise de cefalópodeos de caramujos *B. glabrata* (linhagem BH/IMT e Ourinhos) expostos à diferentes cargas parasitárias contendo 30, 20, 10, 5 e 1 miracídio(os) de *S. mansoni* (BH). Dois períodos diferentes do ciclo assexuado foram avaliados:

- a) 72 horas após infecção pelo miracídios (quando as células germinativas já se diferenciaram em esporocisto);
- b) 14 dias após infecção (quando os esporocistos I começam a se diferenciar em esporocisto II e migrar para a glândula digestiva) (Carvalho; Coelho; Lenzi, 2008).

Desta forma, foram estabelecidos subgrupos de caramujos de cada uma das linhagens (*B. glabrata* BH e Ourinhos/SP) com 10 exemplares por grupo conforme ilustrado na Figura 8.

Figura 8 - Cronograma experimental utilizado para realização dos testes moleculares de caramujos Ourinhos/SP e BH/IMT expostos a crescentes cargas parasitárias de *S. mansoni* (BH)

Fonte: Arquivo Pessoal (2019).

5.7.1 Retirada dos cefalopódeos

Foram selecionados caramujos com aproximadamente o mesmo tamanho durante a retirada dos cefalopódeos e realização dos experimentos de biologia molecular.

Para identificação das amostras foi utilizado o código apresentado na Figura 9.

Figura 9 - Nomenclatura designada para identificação das amostras submetidas ao diagnóstico por cPCR e qPCR da presença de *S. mansoni*

Para a dissecação, os caramujos *B. glabrata* foram retirados da concha pela submersão em um recipiente com água à 70°C, até o desprendimento da concha.

Com duas pinças de pontas finas, o exemplar foi segurado pela concha, onde o cefalopodeo foi pinçado transversalmente, puxando-o com uma suave tração (Figura 10). Com esse procedimento, o músculo se desprende e a parte mole pôde ser extraída.

Figura 10 - Retirada da concha para secção da massa cefalopodal com auxílio de lupa 100x

Fonte: Brasil, 2008.

A massa cefalopodal (Figura 11) foi seccionada com auxílio de bisturi (5 cm), sendo utilizada uma lâmina por molusco, armazenada em um microtubo de 1,7 ml e então pesada em balança analítica para ser posteriormente submetida ao processo de extração de DNA.

Figura 11 - Anatomia do *Biomphalaria*

Fonte: Melo, 2018 (modificado).

Legenda: Parte mole de molusco do gênero *Biomphalaria*, vista do lado esquerdo, com o manto parcialmente levantado. A região destacada foi excisada (massa cefalopodal e componente visceral incluindo o hepatopâncreas e o ovotestis). Estas regiões foram utilizadas para extração de DNA an: ânus; c: cabeça; cl: crista dorsolateral; cm: colar do manto; cp: cavidade pulmonar; ct: crista retal; et: estômago; ga: glândula de albúmen; gd: glândula digestiva ou hepatopâncreas; ia: intestino anterior; im: intestino médio; ip: intestino posterior; mc: músculo columelar; mf: mufla; ms: massa cefalopodal; om: orifício genital masculino; ot: ovotestis; p: pé; pn: pneumotorax; ps: pseudobrânquia; rt: reto; te: tentáculo; tr: tubo renal; vp: veia pulmonar; vr: veia renal.

5.8 Obtenção de *pool* com 20 casais de vermes adultos para a padronização dos ensaios de PCR

Cinco amostras com vinte casais de *S. mansoni* foram obtidas a partir de hamsters infectados por via subcutânea com cerca de 200 a 300 cercárias de *S. mansoni* (linhagem BH) e sacrificados após 49 a 56 dias de infecção (item 5.6). Os animais infectados foram anestesiados e sacrificados, sendo realizada uma incisão tóraco-abdominal longitudinal para exposição das vísceras. Após secção da veia porta, infundiu-se 50 mL de solução salina a 0,85%, contendo EDTA (Ácido etilenodiamino tetra-acético), no ventrículo esquerdo, utilizando-se uma seringa de 20 mL. Os vermes adultos foram obtidos após a perfusão do sistema porta, sendo retirados da cavidade abdominal, contados e estocados em freezer -20°C (Espírito-Santo, 2013).

5.9 Extração do DNA de *S. mansoni*

Para extração de DNA de *S. mansoni* foi utilizado o kit comercial *QIAamp® DNA Minikit* (Qiagen) e o procedimento foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante.

Primeiramente, vermes adultos de *S. mansoni* foram selecionados em cinco amostras contendo um *pool* com 20 casais cada (Figuras 10 e 11).

Após extração o DNA genômico total das amostras foi quantificado pelo equipamento *NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.8®* (Thermo Scientific, Delaware, Estados Unidos).

5.10 Seleção de *primers* e sonda para amplificação do genoma de *S. mansoni*

Os *primers* e sondas selecionados para a detecção de *S. mansoni* por PCR Real-time (*Taqman®qPCR*) e PCR convencional (cPCR) já são descritos na literatura (Tabela 1), e o procedimento esquemático da padronização dos ensaios moleculares procederam-se conforme diagrama demonstrado Figura 12.

Tabela 2 - Cronograma de realização dos ensaios experimentais, utilizando diferentes sequências de iniciadores na padronização da detecção de caramujo *B. glabrata* exposto à diferentes cargas parasitárias de *S. mansoni*

Primer/ Sonda	Sequência 5' - 3'	Região de anelamento	Tamanho fragmento amplificado	Referência	Metodologia
S_mansoni_F2	CCGACCAACCGTTCTATGA	DNA r repetição em <i>tandem</i>	121 pb	Espírito- Santo et al., 2015	PCR em tempo real
S_mansoni_R2	CACGCTCTCGCAAATAATCTAAA				
S_mansoni_P02	TCGTTGTATCTCCGAAACCACTGGACG				
Smcyt748F	CCCTGCCAAATGAAGAGAAAAC	COX1 DNA mt	99 pb	ten Hove et al., 2008	
Smcyt847FR	TGGGTGTGGAATTGGTTGAAC				
Smcyt785T	FAM-5'- CCAAAACCAGACCCCTCTCAAATTG-3'- BHC1				
SmF	GAGATCAAGTGTGACAGTTTTGC	Espécie específico 28S do DNA	350 pb	Sandoval et al., 2006	PCR convencional
SmR	ACAGTGC GCGCGTCGTAAGC				

Fonte: Arquivo Pessoal (2019).

Figura 12 - Desenho do estudo ilustrando diagrama referente à etapa inicial proposta no emprego das técnicas moleculares

Fonte: Arquivo Pessoal (2019).

5.11 Detecção do DNA de *S. mansoni* por PCR

Posteriormente à padronização, os primers foram testados na pesquisa de *S. mansoni* em amostras de DNA extraídas de cefalopódeos retirados de caramujos *B. glabrata* (BH) expostos experimentalmente ao parasita e não expostos (controle negativo) para avaliação da seletividade das sequências para o material genético parasitário intra-molusco.

5.12 PCR convencional (cPCR)

A amplificação do DNA de *S. mansoni* foi realizada utilizando-se a enzima *Platinum[®]Taq DNA Polymerase* (Thermo Scientific, São Paulo, Brasil). As concentrações de cada reagente e os parâmetros das reações foram feitos conforme protocolo descrito por Sandoval et al. (2006b), onde o volume final consistia em 25 µL contendo 2,5 µL de tampão de PCR específico da enzima, 0,5 mM de dNTP, 3 mM de MgCl₂, 2 µM de cada *primer* (SmF-5-GAGATCAAGTGTGACAGTTTTGC) SmR (5-ACAGTGCGCGCGTCGTAAGC), 2,5 U da enzima *Platinum[®]Taq* e 1 µL de DNA extraído. Para a amplificação a reação foi submetida a 35 ciclos de variação de temperatura após um passo de denaturação inicial à 94°C por 5 minutos: 94°C por 20 s, 65°C por 20 s, e 72°C por 30 s. Após a ciclagem a reação foi submetida a

incubação a 72°C por 5 minutos para finalização de alguma polimerização incompleta.

A detecção do DNA amplificado foi feita por eletroforese em agarose gel 1,5%, corante *SYBR® Safe DNA Gel Stain* (Thermo Scientific, São Paulo, Brasil) e padrão *DNA Ladder* específico (Thermo Scientific, São Paulo, Brasil) para conferir o tamanho do *amplicon* gerado. Para as corridas foi utilizado tampão tris-borato-EDTA 1X.

5.13 TaqMan® qPCR

Para detecção do DNA de *S. mansoni* por *Taqman® qPCR* foram utilizados os conjuntos de *primers* S_mansoni F2, S_mansoni R2; S_mansoni 748_F e Smcyt847_R. O reagente *TaqMan® Universal PCR Master Mix* (Life Technologies). A reação foi realizada com 10 µl de *TaqMan Universal Mastermix®*, 2 µl de cada *primer* na concentração de 10 µM (S_mansoni_F2 e S_mansoni_R2 ou Smcyt748_F e Smcyt847_R), 2 µl da sonda específica na concentração de 2,5 µM (S_mansoni_P02 ou Smcyt785_T) e 1 µl do DNA extraído.

Juntamente com amplificação do DNA extraído, foi amplificado um DNA controle interno (*TaqMan® Exogenous Internal Positive Control Reagents, Life Technologies*) para avaliar a presença de inibidores na reação, evitando dessa forma resultados falso-negativos. Foram incluídos controles negativos e positivos em cada placa de reação.

A amplificação e detecção foram realizadas no equipamento 7500 fast *Real-Time PCR System®* (Applied Biosystems) com os seguintes ciclos de variação de temperatura: 50°C por 2 minutos; 95°C por 10 minutos; 40 ciclos de 95°C por 15 segundos seguindo de 60°C por 1 minuto.

5.14 Avaliação do potencial de infecciosidade das cercárias liberadas pelos caramujos coletados em Ourinhos/SP

A infectividade das cercárias eliminadas pelos caramujos *B. glabrata* experimentalmente infectados foi analisada de acordo com o número e morfologia aproximados das mesmas, utilizando uma placa de petri, solução de Lugol e observação em lupa.

Além disso, para avaliar a reprodução ou não da EM experimental, cinco hamsters foram infectados com 300 cercárias de todos os grupos. Dessa forma,

após 30 dias da infecção, os hamsters foram eutanasiados e, posteriormente, avaliados quanto à presença de vermes adultos e ovos de *S. mansoni*, seguindo metodologia descrita na manutenção do ciclo laboratorial dessa parasitose. A positividade de *S. mansoni* nas fezes do hamster foi avaliada pela técnica de Kato-Katz.

Posteriormente, também realizamos uma análise anatomopatológica dos tecidos biopsiados do fígado, pulmão, rim, intestino, para observar o impacto da infecção nesses animais. Para esse processo, os fragmentos de tecido, foram emblocados em parafina, seccionados, corados e examinados por microscopia óptica.

5.15 Avaliação do comportamento da infecção experimental por *S. mansoni* cepa BH em *B. glabrata* linhagem Ourinhos

Após o estudo molecular realizou-se avaliação parasitológica e análise histopatológica da infecção do hospedeiro definitivo (*Mesocricetus auratus*) por cercárias de *S. mansoni* cepa BH originária de caramujos *B. glabrata* da linhagem Ourinhos. Os resultados foram comparados com de *S. mansoni* cepa BH originária de caramujos *B. glabrata* rotineiras do IMT. Portanto, constituiu-se três grupos.

5.15.1 Avaliação parasitológica de hamsters infectados por *S. mansoni* originária de caramujos cepa BH (IMT) e Ourinhos/SP

Grupo I - cinco animais infectados com 200 cercárias de *S. mansoni* da cepa IMT originários de caramujos BH/IMT;

Grupo II - cinco animais infectados com 200 cercárias de *S. mansoni* da cepa Ourinhos/SP;

Grupo III - dois animais não infectados (controle negativo).

Após a inoculação, os hamsters foram distribuídos em três gaiolas grandes (49x34x16 cm), onde receberam ao longo do experimento água e ração, sendo mantido no Biotério de Animais do Instituto de Medicina Tropical (IMT), São Paulo, Brasil.

As fezes dos hamsters dos três grupos foram coletadas semanalmente, a partir do sétimo dia após a infecção, estendendo-se até o quadragésimo segundo dia, conforme cronograma ilustrado na Figura 13.

Figura 13 - Cronograma da avaliação parasitológica de hamsters infectados por *S. mansoni* originária de caramujos cepa BH (IMT) e Ourinhos/SP

Fonte: Arquivo Pessoal (2019).

Para coleta das fezes, os animais foram reunidos por grupo em três gaiolas metabólicas (50x35x35) (Sorgob - São Paulo/SP/Brasil), corretamente identificadas, onde permaneceram por um período de 24 horas. As fezes foram recolhidas em *pool* e armazenadas em frascos coletores, hidratadas em água destilada e mantidas sob refrigeração em geladeira à 6°C.

Posteriormente o material fecal correspondente de cada grupo foi homogeneizado e processado pela técnica de Kato-Katz, conforme instruções do fabricante. Os resultados foram expressos pela média do número de ovos encontrados por grama de fezes, sendo feitas e observadas três lâminas por grupo.

5.15.2 Análise histológica dos segmentos viscerais de hamsters infectados por *S. mansoni* originária de caramujos cepa BH (IMT) e Ourinhos

A análise histológica procedeu-se após a avaliação parasitológica. Dessa forma, a eutanásia dos animais dos três grupos foi realizada no quadragésimo terceiro dia pós-infecção. Em seguida, realizou-se uma perfusão para observar a presença de vermes adultos, além de retirar os órgãos definidos para análise: fígado, baço, intestino grosso e delgado, rim e pulmão.

Os órgãos de cada animal eutanasiado foram acondicionados em recipientes de vidro corretamente identificados e fixados em formalina 10% tamponada pH 7.2. Após o emblocamento dos fragmentos em parafina, foram efetuados cortes de 3-4 micras de espessura, em micrótomos *Leica RM2125 RTS*[®] (Leica Biosystems Nussloch GmbH 2019) e corados por hematoxilina-eosina (HE). As lâminas foram preparadas para posterior análise, na microscopia óptica, utilizando um microscópio Olympus-CX41.

6 RESULTADOS

6.1 Desenvolvimento da linhagem laboratorial de *B. glabrata* de Ourinhos

Os resultados demonstrados na Figura 14 ilustram que cinco exemplares de moluscos *B. glabrata* coletados do lago Christoni em Ourinhos (São Paulo), foram suficientes para o estabelecimento de uma criação desta linhagem em laboratório, indicando uma alta capacidade na reprodução e povoamento quando expostos às condições pré-estabelecidas pelo ciclo já vigente no laboratório do IMT.

Figura 14 - Resultado da criação experimental de *B. glabrata* desenvolvida a partir de cinco caramujos coletados de Ourinhos/SP*

Fonte: Arquivo Pessoal (2019).

*Nas placas de isopor são depositadas as desovas dos moluscos.

6.2 Extração de DNA em *pool* com 20 casais de vermes adultos de *S. mansoni* em cinco amostras

A quantificação do DNA extraído dos 5 *pools* com 20 casais de vermes adultos de *S. mansoni* foi realizada pelo equipamento *NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.8®*, e indicou que o procedimento de extração utilizando o kit comercial *QIAamp® DNA MiniKit* (Qiagen) foi satisfatório para a realização dos ensaios de PCR no teste dos *primers* e sondas selecionados para detecção do DNA de *S. mansoni*. A concentração obtida variou de 95,8 ng/uL à 225,8 ng/uL, conforme descrito na Tabela 3.

Tabela 3 - Concentração de DNA de cinco amostras com 20 casais de *S. mansoni* em *pool*

AMOSTRA		[] ng/ μ L
1	V1_Kit	116,2
2	V2_Kit	95,8
3	V3_Kit	157,8
4	V4_Kit	225,8
5	V5_Kit	185,8
6	CN	-

Fonte: Arquivo Pessoal (2019).

6.3 cPCR resultante de cinco amostras contendo 20 casais de vermes adultos de *S. mansoni* em *pool*

A amplificação das amostras com os vermes adultos foi obtida na cPCR de todos os *primers* analisados, no entanto, o marcador alvo para a sequência 28S do DNAr demonstrou um melhor resultado na visualização do perfil das bandas quando comparado com o da sequência COX1 do DNAm (Figura 15, 16).

Figura 15 - Gel de amplificação em agarose 2%, ilustrando os produtos de PCR de 20 casais de verme adulto de *S. mansoni*, utilizando *primer* espécie-específico, subunidade 28S do DNAr, originando sequências com 395 pb (1-5) e controle negativo (6)

Fonte: Arquivo Pessoal (2019).

Figura 16 - Gel de amplificação em agarose 2%, ilustrando os produtos de PCR de 20 casais de verme adulto de *S. mansoni*, COX1 do DNAm, originando sequências com 99 pb (1-5) e controle negativo (6)

Fonte: Arquivo Pessoal (2019).

Para avaliar a especificidade dos *primers* os produtos de amplificação para cada protocolo foram submetidos ao sequenciamento. As sequências obtidas foram comparadas com as sequências do banco de dados GenBank usando a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) do NCBI (*National Center for Biotechnology Information* - www.ncbi.nlm.nih.gov). A especificidade dos *primers* utilizados foi comprovada pela similaridade com sequências de *S. mansoni* depositadas no GenBank (Figuras 17 e 18).

Figura 17 - Blast resultante do sequenciamento do cPCR utilizando *primer* Smcyt748F, amplificando o gene COX do DNAm de *S. mansoni*

Fonte: Arquivo Pessoal (2019).

Figura 18 - Blast resultante do sequenciamento do produto de cPCR utilizando *primer* SmR e SmF, amplificando subunidade 28S do DNAr de *S. mansoni*

Fonte: Arquivo Pessoal (2019).

6.4 TaqMan® qPCR's resultantes de cinco amostras contendo 20 casais de vermes adultos de *S. mansoni* em *pool*

Com relação à qPCR, os *primers* e sondas apresentaram um bom desempenho quando analisado os valores de Ct (*Cycle Threshold*®) expressos na amplificação da sequência de repetição em *tandem* já utilizada para diagnóstico de *S. mansoni* em estudo anterior (Pontes; Dias-Neto e Rabello, 2002) e adaptada ao qPCR em trabalhos anteriores do nosso grupo (Espírito-Santo et al., 2012). Estes resultados apontam o funcionamento e viabilidade dos marcadores designados para a detecção molecular da presença do parasita.

As Tabelas 4 e Figura 19 representam respectivamente os resultados da amplificação por *TaqMan*® qPCR das cinco amostras, utilizando as sequências COX1 do DNAm (ten Hove et al., 2008) e subunidade de repetição em *tandem* do DNAr, respectivamente (Tabela 5; Figura 20).

Tabela 4 - Produto da amplificação obtido por *TaqMan® qPCR*. A positividade e quantidade de DNA obtido é expresso por meio da unidade Ct (*Cycle Threshold*), onde observou-se uma variação de (9,35 à 13,93) e média de 12,024 entre as cinco amostras analisadas

AMOSTRA	SEQUÊNCIA ALVO	CT
V1_Kit	S_mansoni	9,35
V2_Kit	S_mansoni	13,67
V3_Kit	S_mansoni	12,6
V4_Kit	S_mansoni	10,57
V5_Kit	S_mansoni	13,94
MÉDIA		12,02

Fonte: Arquivo Pessoal (2019).

Figura 19 - Amplificação exponencial das amostras descritas na Tabela 3, ilustrando o limiar de amplificação relatado em Ct, ($\Delta Rn \pm 0,14$)

Fonte: Arquivo Pessoal (2019).

Tabela 5 - Produto da amplificação por qPCR TaqMan® de cinco amostras com 20 casais de *S. mansoni* em *pool*. Onde observou-se uma variação de (16,77 à 17,77) e média de 17,18 entre os Ct's das cinco amostras analisadas

AMOSTRA	SEQUÊNCIA ALVO	CT
V1_Kit	S_mansoni	16,77
V2_Kit	S_mansoni	17,62
V3_Kit	S_mansoni	16,54
V4_Kit	S_mansoni	17,22
V5_Kit	S_mansoni	17,77
MÉDIA		17,184

Fonte: Arquivo Pessoal (2019).

Figura 20 - Amplificação exponencial das amostras descritas na Tabela 4, ilustrando o limiar de amplificação expresso em ΔRn (0,157)

Fonte: Arquivo Pessoal (2019).

6.5 Ensaio da especificidade para o material genético de *S. mansoni* intra-molusco

Na escolha dos protocolos de padronização molecular, obteve-se uma especificidade nos produtos de cPCR para o gene alvo de *S. mansoni* (28S do DNAr) quando se analisou os cefalópódeos de *B. glabrata* não exposto aos miracídios (Figura 21: 1a - 10a), e exposto à 30 miracídios de *S. mansoni* (Figura 21: 1b - 10b). Embora não tenha sido evidenciado o produto de amplificação em uma das amostras, constatou-se a confiabilidade do resultado devido as bandas resultantes no controle positivo com 20 casais de vermes adultos (11a).

Figura 21 - Gel de amplificação em agarose 2%, originando sequências com 395 pb e bandas padrão com 100 pb

Fonte: Arquivo Pessoal (2019).

As Figuras 22 e 23 relatam a confirmação da especificidade do *primer* sequência de repetição em *tandem* do DNAr, com protocolo para qPCR padronizado por (Espírito-Santo et al., 2012), onde nota-se a taxa de detecção expressa em valores de Ct e ΔRn médio de 0,43.

Figura 22 - Resultado das amplificações obtidas em teste qPCR na análise de caramujos infectados com *S. mansoni* (Inf-IMT), e caramujos controle negativos (CN_IMT)

Sample	Target	Quantity (Mean)	Quantity (Std Dev)	Ct (Mean)	Ct (Std Dev)
CP_VERME	S_Mansoni			15.00	
Sample 10_CN_IMT	S_Mansoni				
Sample 10_Inf_IMT	S_Mansoni			33.47	
Sample 1_CN_IMT	S_Mansoni				
Sample 1_Inf_IMT	S_Mansoni			36.42	
Sample 2_CN_IMT	S_Mansoni				
Sample 2_Inf_IMT	S_Mansoni			35.88	
Sample 3_CN_IMT	S_Mansoni				
Sample 3_Inf_IMT	S_Mansoni			39.23	
Sample 4_CN_IMT	S_Mansoni				
Sample 4_Inf_IMT	S_Mansoni			36.94	
Sample 5_CN_IMT	S_Mansoni				
Sample 5_Inf_IMT	S_Mansoni			34.46	
Sample 6_CN_IMT	S_Mansoni				
Sample 6_Inf_IMT	S_Mansoni			35.30	
Sample 7_CN_IMT	S_Mansoni				
Sample 7_Inf_IMT	S_Mansoni			36.85	
Sample 8_CN_IMT	S_Mansoni				
Sample 8_Inf_IMT	S_Mansoni			36.26	
Sample 9_CN_IMT	S_Mansoni				
Sample 9_Inf_IMT	S_Mansoni			34.03	

Fonte: Arquivo Pessoal (2019).

Figura 23 - Amplificação exponencial ilustrando o limiar de amplificação da qPCR de caramujos infectados com 30 miracídeos de *S. mansoni* após 72 horas de infecção ($\Delta Rn \pm 0,43$)

Fonte: Arquivo Pessoal (2019).

As Figuras 24 e 25 relatam a confirmação da especificidade do primer sequência COX1 do DNAm, onde nota-se a taxa de detecção expressa em valores de Ct e ΔRn 0,43

Figura 24 - Resultado das amplificações obtidas em teste qPCR na análise de caramujos infectados com *S. mansoni* (72h_30mir), e caramujos controle negativos (CN_72h)

Sample	Target	Quantity (Mean)	Quantity (Std Dev)	CT (Mean)	CT (Std Dev)
CP_poolVermes_2	Hove_2008	□	□	15.72	□
P10_72h_30mir	Hove_2008	□	□	29.20	□
P10_CN_72h	Hove_2008	□	□	□	□
P1_72h_30mir	Hove_2008	□	□	31.18	□
P1_CN_72h	Hove_2008	□	□	□	□
P2_72h_30mir	Hove_2008	□	□	29.75	□
P2_CN_72h	Hove_2008	□	□	□	□
P3_72h_30mir	Hove_2008	□	□	30.85	□
P3_CN_72h	Hove_2008	□	□	□	□
P4_72h_30mir	Hove_2008	□	□	31.88	□
P4_CN_72h	Hove_2008	□	□	□	□
P5_72h_30mir	Hove_2008	□	□	29.32	□
P5_CN_72h	Hove_2008	□	□	□	□
P6_72h_30mir	Hove_2008	□	□	29.29	□
P6_CN_72h	Hove_2008	□	□	□	□
P7_72h_30mir	Hove_2008	□	□	29.09	□
P7_CN_72h	Hove_2008	□	□	□	□
P8_72h_30mir	Hove_2008	□	□	30.18	□
P8_CN_72h	Hove_2008	□	□	□	□
P9_72h_30mir	Hove_2008	□	□	28.59	□
P9_CN_72h	Hove_2008	□	□	□	□

Fonte: Arquivo Pessoal (2019).

Figura 25 - Amplificação exponencial ilustrando o limiar de amplificação da qPCR de caramujos infectados com 30 miracídios de *S. mansoni* após 72 horas de infecção e ($\Delta Rn \pm 0,11$)

Fonte: Arquivo Pessoal (2019).

6.6 Diagnóstico molecular da infecção de caramujos *B. glabrata* linhagem Ourinhos e BH/IMT

6.6.1 PCR convencional (cPCR)

Os resultados de cPCR obtidos na amplificação do DNA de caramujos *B. glabrata* linhagem Ourinhos e BH/IMT, expostos a cargas parasitárias crescentes de *S. mansoni* (BH), demonstraram uma aleatoriedade na positividade quando analisados 72 horas e 14 dias a exposição ao parasita (Tabela 6). A PCR originou produtos de amplificação com 350 pb cada na análise com a subunidade 28S do DNAr (vide APÊNDICE A ao H).

Tabela 6 - Análise 72 horas e 14 dias após a exposição a crescentes cargas parasitárias (CP), ilustrando amostras positivas nos experimentos de cPCR em agrupamentos com 10 caramujos *B. glabrata* da linhagem Ourinhos (OU) e BH (IMT)

cPCR subunidade 28S do DNAr					
TOTAL DE AMOSTRAS POSITIVAS					
72h / CP	OU	IMT	14 d / CP	OU	IMT
1	1	0	1	0	0
5	1	0	5	6	2
10	6	6	10	4	2
20	7	7	20	1	2
30	4	2	30	8	10

Fonte: Arquivo Pessoal (2019).

6.6.2 TaqMan® qPCR

Com relação aos produtos obtidos nas reações de qPCR, foi mantida a aleatoriedade nos dois períodos após a exposição crescente ao parasita (Tabela 7 e 8). Todavia, quando comparados os dois marcadores, foi observado um aumento nos valores de Ct e ΔRn para a sequência COX1 do DNAm (ten Hove et al., 2008), vide Tabela em APÊNDICE (APÊNDICE I).

Tabela 7 - Total de amostras positivas nas reações de com o gene COX1 do DNAm, 72 horas e 14 dias após exposição a crescentes cargas parasitárias (CP) de miracídios de *S. mansoni*

qPCR com sequência de DNAm, gene COX1					
TOTAL DE AMOSTRAS POSITIVAS					
72h / CP	OU	IMT	14 d / CP	OU	IMT
1	1	0	1	0	0
5	1	0	5	6	2
10	6	6	10	4	2
20	7	7	20	1	3
30	4	3	30	8	10

Fonte: Arquivo Pessoal (2019).

Tabela 8 - Total de amostras positivas nas reações qPCR com marcador de repetição em *tandem*, 72 horas e 14 dias após exposição a crescentes cargas parasitárias (CP) de miracídios de *S. mansoni*

qPCR com sequência de repetição em <i>tandem</i> do DNAr					
TOTAL DE AMOSTRAS POSITIVAS					
72h / CP	OU	IMT	14 d / CP	OU	IMT
1	0	0	1	0	0
5	1	0	5	8	2
10	6	7	10	10	5
20	7	8	20	2	5
30	4	4	30	10	10

Fonte: Arquivo Pessoal (2019).

Quando avaliado o comportamento das reações frente à um controle interno (IPC), não houve indicativos da presença de inibidores em nenhum dos ensaios realizados (Figuras 26-29).

Figura 26 - Percentual de amostras positivas por carga parasitária, com 72 horas de infecção na amplificação com a sequência de DNAm, gene COX1

Fonte: Arquivo Pessoal (2019).

Figura 27 - Curva do percentual de amostras positivas por carga parasitária, com 14 dias de infecção na amplificação utilizando a sequência de DNAm, gene COX1

Fonte: Arquivo Pessoal (2019).

Figura 28 - Curva do percentual de amostras positivas por carga parasitária, com 72 horas de infecção na amplificação originando sequências em *tandem* com 121 pb

Fonte: Arquivo Pessoal (2019).

Figura 29 - Curva do percentual de amostras positivas por carga parasitária, com 14 dias de infecção na amplificação originando sequências em *tandem* com 121 pb

Fonte: Arquivo Pessoal (2019)

Com relação à variação estatística do comportamento das reações. A cPCR, com 72 horas da linhagem Ourinhos, retratou um valor mínimo de 10% ($n=1/10$) nas infecções com carga parasitária 5 miracídeos, e valor máximo de 70% ($n=7/10$), nas infecções com cargas 20 miracídeos.

Aos 14 dias da infecção, essa taxa de detecção do DNA genômico, também apresentou variações. Observou-se como valores mínimos 0% ($n=0/10$), nas infecções com um miracídeos, tanto na cepa BH como na Ourinhos. Quanto às infecções em massa, com 30 miracídeos, o valor variou de 80% ($n=3/5$) à 100% ($n=10/10$).

As Tabelas 9, 10, 11 e 12 representam uma síntese dos resultados gerais obtidos nos ensaios moleculares para facilitar o processo de comparação entre as técnicas realizadas, por meio desta, observou-se que embora a *TaqMan*[®]qPCR apresentou maior sensibilidade em relação à cPCR, não houve uma homogeneidade na linearidade entre carga-parasitária e dose-resposta de detecção da infecção do molusco, ou seja, a positividade das amostras se deu de forma aleatória, ao invés de obedecer o aumento crescente na quantidade de parasitas expostos ao molusco.

Tabela 9 - Relação quantitativa entre os resultados obtidos com a utilização de diferentes técnicas de PCR na detecção de caramujos oriundos de Ourinhos após 72 horas da exposição experimental ao *S. mansoni* BH

Carga parasitária (n de miracídeos utilizados para infecção)	N de caramujos infectados	Avaliação 72 horas pós infecção						
		N de caramujos sobreviventes e submetidos a extração	No de positivos RT_PCR ten Hove	%	N de positivos RT_PCR ES/Pontes	%	N de positivos PCR convencional Sandoval	%
1	10	10	1	10	2	20	1	10
5	10	10	1	10	1	10	1	10
10	10	10	6	60	6	60	6	60
20	10	10	7	70	7	70	7	70
30	10	10	4	40	4	40	4	40

Fonte: Arquivo Pessoal (2019).

Tabela 10 - Relação quantitativa entre os resultados obtidos com a utilização de diferentes técnicas de PCR na detecção de caramujos oriundos de Ourinhos após 14 dias da exposição experimental ao *S. mansoni* BH

Carga parasitária (n de miracídeos utilizados para infecção)	N de caramujos infectados	Avaliação 14 dias pós infecção						
		N de caramujos sobreviventes e submetidos a extração	No de positivos RT_PCR ten Hove	%	N de positivos RT_PCR ES/Pontes	%	N de positivos PCR convencional Sandoval	%
1	10	9	0	0	0	0	0	0
5	10	9	6	67	8	89	6	67
10	10	4	4	100	4	100	4	100
20	10	10	1	10	2	20	1	10
30	10	5	3	60	5	100	3	60

Fonte: Arquivo Pessoal (2019).

Tabela 11 - Relação quantitativa entre os resultados obtidos com a utilização de diferentes técnicas de PCR na detecção de caramujos BH/IMT já adaptados ao ciclo após 72 horas da exposição experimental ao *S. mansoni* BH

Carga parasitária (n de miracídeos utilizados para infecção)	N de caramujos infectados	Avaliação 72 horas pós infecção						
		N de caramujos sobreviventes e submetidos a extração	No de positivos RT_PCR ten Hove	%	N de positivos RT_PCR ES/Pontes	%	N de positivos PCR convencional Sandoval	%
1	10	10	0	0	1	10	0	0
5	10	10	0	0	0	0	0	0
10	10	10	6	60	7	70	6	60
20	10	10	7	70	8	80	7	70
30	10	10	3	30	4	40	2	20

Fonte: Arquivo Pessoal (2019).

Tabela 12 - Relação quantitativa entre os resultados obtidos com a utilização de diferentes técnicas de PCR na detecção de caramujos BH/IMT já adaptados ao ciclo após 14 dias da exposição experimental ao *S. mansoni* BH

Carga parasitária (n de miracídeos utilizados para infecção)	N de caramujos infectados	Avaliação 14 dias pós infecção						
		N de caramujos sobreviventes e submetidos a extração	No de positivos RT_PCR ten Hove	%	N de positivos RT_PCR ES/Pontes	%	N de positivos PCR convencional Sandoval	%
1	10	10	0	0	0	0	0	0
5	10	10	2	20	2	20	2	20
10	10	10	2	20	5	50	2	20
20	10	10	3	30	5	50	2	20
30	10	10	10	100	10	100	10	100

Fonte: Arquivo Pessoal (2019).

6.7 Avaliação parasitológica

Na avaliação parasitológica por KK, os resultados demonstraram que o início do processo de oviposição dos hamsters infectados com as cercárias provenientes dos caramujos de Ourinhos, ocorreu em média a partir do 42º dia do ciclo. Todavia, não foram encontrados ovos nas fezes dos animais infectados com as cercárias originadas dos caramujos BH/IMT em de seis semanas de infecção (Tabela 13).

Tabelas 13 - Média de ovos encontrados por grama de fezes nas análises no Kato-Katz de hamsters infectados com *S. mansoni* originário de caramujos BH (G1) Ourinhos (G2) e controle negativo (G3), respectivamente

N de ovos <i>S. mansoni</i>	PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO PARASITOLÓGICA (KK)																	
	Semana 1			Semana 2			Semana 3			Semana 4			Semana 5			Semana 6		
	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3
	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	120	(-)

Fonte: Arquivo Pessoal (2019).

6.8 Histopatologia de hamsters infectados com *S. mansoni* provenientes das cercárias de caramujos Ourinhos e BH

O perfil dos órgãos analisados nos ensaios de histopatologia demonstrou que foi observado reatividade na infecção por ambos os grupos de hamsters analisados, sendo que os órgãos analisados para os hamsters infectados pelas cercárias do grupo BH/IMT mais comprometidos e reativos à infecção neste período de tempo. Foi possível notar intensa reação inflamatória na maioria dos órgãos analisados de ambos os grupos analisados (Figura 30).

As figuras 30 à 33 ilustram os achados histopatológicos deste ensaio encontrados na análise dos cinco principais órgãos acometidos pelo *S. mansoni*.

Figura 30 - Quadro com os achados anatomohistopatológicos dos grupos infectados por *S. mansoni* proveniente de caramujos e BH/IMT (G1) e Ourinhos (G2)

I - Perfil Histológico dos Hamsters (<i>Mesocricetus auratus</i>) Inoculados com <i>S. mansoni</i>		
ÓRGÃOS	ANIMAL 1	
	GI IMT	G2 OURINHOS
Pulmão	(+) vermes adultos e pneumonite	sem alterações
Intestino Grosso	(-)	sem alterações
Intestino Delgado	(-)	(-) achados parasitários
Fígado	(+) granulomas com ovos	fibrose portal/granulomas (+)
Baço	polpa branca aumentada e reativa	infiltrado inflamatório (T e B) zona branca e vermelha
ÓRGÃOS	ANIMAL 2	
	GI IMT	G2 OURINHOS
Pulmão	pneumonite s/ parasitas	sem alterações
Intestino Grosso	(-)	sem alterações
Intestino Delgado	(-)	sem alterações
Fígado	(+) granulomas	(+) granulomas com miracídios
Baço	polpa branca aumentada e reativa	sem alterações
ÓRGÃOS	ANIMAL 3	
	GI IMT	G2 OURINHOS
Pulmão	pneumonite com ovos intersticiais	pneumonite s/ achados parasitários
Intestino Grosso	(+) granulomas com ovos	ovos com miracídios (+) discreto infiltrado inflamatório
Intestino Delgado	(+) granulomas com ovos	ovos com miracídios (+) discreto infiltrado inflamatório
Fígado	(+) granulomas com ovos	(+) granulomas, ovos íntegros com miracídios
Baço	polpa branca aumentada e reativa	discreta leucocitose
ÓRGÃOS	ANIMAL 4	
	GI IMT	G2 OURINHOS
Pulmão	pulmonite sem parasita	pneumonite intersticial sem achados parasitários
Intestino Grosso	(-) negativa s/ achados parasitários	sem alterações
Intestino Delgado	(+) granulomas com ovos	sem alterações
Fígado	inflamação s/ achados parasitários	infiltrado portal com granuloma e ovos
Baço	(-)	reação inflamatória polpa branca e vermelha

Fonte: Arquivo Pessoal (2019).

Figura 31 - Granuloma hepático intersticial em fígado de hamster infectado com *S. mansoni* (BH), corado em HE e originado de *B. glabrata* Ourinhos (Christoni)

Fonte: Arquivo Pessoal (2019).

Figura 32 - Granuloma pulmonar e pneumonite intersticial em pulmão de hamster infectado com *S. mansoni* (BH), corado em HE e originado de *B. glabrata* IMT

Fonte: Arquivo Pessoal (2019).

Figura 33 - Casal de verme adulto, com infiltrado leucocitário, encontrado no pulmão de hamsters infectados com cercárias do grupo controle positivo IMT após 43 dias de infecção cercariana

Fonte: Arquivo Pessoal (2019).

7 DISCUSSÃO

Este estudo avaliou experimentalmente, o perfil da infecção de *B. glabrata* por *S. mansoni*, cujo *habitat* natural é o córrego Christoni, bairro do município de Ourinhos, o qual encontra-se entre as áreas de baixa endemicidade do estado de São Paulo (Tuan, 2009; Bezerra et al., 2018)

Os moluscos *B. glabrata* de Ourinhos/SP foram transferidos para o laboratório de Imunopatologia da Esquistossomose LIM-06/IMT/SP. Neste local, estabeleceu-se a criação de uma nova linhagem laboratorial, além daquela previamente existente para manutenção experimental do ciclo de *S. mansoni* com caramujos BH.

Os resultados apontaram para a capacidade de adaptação desses moluscos, dado que, mesmo em condições diferentes daquelas observadas no habitat natural desses animais, conseguiram atingir uma reprodução considerável, a partir de uma amostra inicial de cinco animais. Esse evento, associado às frequentes desovas, mantém a criação laboratorial de uma nova linhagem perpetuando a espécie.

A literatura aponta que, o potencial reprodutivo é exponencial entre as espécies de caramujos transmissores de *S. mansoni*, apesar da constatação experimental da existência de variações, independentemente da falta de uniformidade dos procedimentos de manutenção em laboratório, do tempo de duração dos experimentos, e da perda da vitalidade causada pela oscilação reprodutiva das colônias (Carvalho; Coelho; Lenzi, 2008; Kalinda; Chimbari; Mukaratirwa, 2017; McCreesh et al., 2014; Lima et al, 2019).

Esse potencial reprodutivo se deve à fisiologia dessas espécies que, apesar de simples, garantem respostas rápidas frente às adversidades no ambiente como: mudanças bruscas de temperaturas da água; períodos de seca e contato com produtos químicos. Os substratos para o deslocamento são folhas, rochas, lodos, pedaços de madeira e detritos (Carvalho; Coelho; Lenzi, 2008; Kalinda; Chimbari; Mukaratirwa, 2017; Sandland e Josephson, 2017).

Assim sendo, as condições estabelecidas no nosso experimento favoreceram o desenvolvimento da linhagem experimental *B. glabrata*, Ourinhos. Isto pode ser tanto devido à alta capacidade de adaptação da presente espécie, quanto à possíveis semelhanças ambientais do laboratório, com o seu criadouro natural, córrego localizado no bairro Christoni, no município de Ourinhos, São Paulo (SP).

Esse trabalho pode colaborar no processo de reflexão sobre o potencial que essa adaptabilidade tem de impactar na transmissão dessa parasitose, associado a

um alto potencial de reprodução e de colonização desses caramujos mesmo em condições restritivas.

Vários trabalhos estudaram a relação parasito-hospedeiro entre *Biomphalaria* spp. e *S. mansoni*, devido a importância desse planorbídeo na cadeia de transmissão desse parasito (Mitta et al., 2012, 2017; Portet et al., 2017; Roger et al., 2008; Theron et al., 2014; Zhang et al., 2018).

No que diz respeito a *Biomphalaria* spp. merece destaque a possibilidade de distribuição heterogênea das populações e a relação densidade/volume hídrico em que a infecção se viabiliza. A aglomeração ou dispersão ao acaso dos caramujos é relevante para transmissão de *S. mansoni*, pois é aceitável que a infecção dos caramujos pelos miracídeos seja facilitada pela proximidade e quantidade de caramujos disponíveis em cada criadouro (Carvalho; Coelho; Lenzi, 2008; McCreesh et al., 2014; Lima et al., 2019).

Alguns trabalhos assinalam que a instalação de focos depende diretamente da suscetibilidade do hospedeiro ao parasito, independentemente de outros determinantes ambientais (Han et al., 2009; Mitta et al., 2012, 2017; Portet et al., 2017).

Outros estudos demonstraram uma preocupação com as intervenções ambientais em áreas endêmicas, pois essas podem favorecer a dispersão dos moluscos *Biomphalaria* spp. para áreas indenes, além da possibilidade de se desenvolver uma malacofauna favorável que, associada a outros fatores, favoreceria o surgimento de novos focos endêmicos (Brasil, 2019; Xu et al., 2010).

Avançar na observação do comportamento da relação parasito-hospedeiro dessa parasitose torna-se não só importante, como também contemporâneo e inovador, dada a sequência de intervenções ambientais, representada por desmatamentos irregulares, crescimento urbano desordenado, construção de barragens inacabadas, rompimento daquelas obsoletas, entre outros (Steinmann et al., 2006; Brasil, 2019; Zheng et al., 2002).

Recentemente, a Fiocruz (Fundação Oswaldo Cruz), emitiu uma nota técnica analisando os impactos à longo prazo do rompimento de barragem da mineradora Vale, ocorrido em 25 de janeiro de 2019 em Brumadinho, município da Grande Belo Horizonte, Minas Gerais. O documento destaca que em consequência do desastre, o processo de transmissão de doenças como a esquistossomose, podem ser

favorecidos pelo contato com rios contaminados por esgotos domésticos, e a presença de caramujos infectados (Brasil, 2019).

Ainda dentro dessa temática, outro estudo relata que, alguns estados do Nordeste Setentrional passam por ampla intervenção eco-bio-social gerada pelo Projeto de Integração do Rio São Francisco (PISF), que estima beneficiar 12 milhões de pessoas em 390 municípios, sendo algumas áreas endêmicas de esquistossomose (Bezerra et al., 2018). Isto poderá contribuir não somente para dispersão ou introdução de hospedeiros intermediários, que associada ao aumento dos movimentos migratórios oriundos de áreas endêmicas, pode expandir os focos de transmissão (Pinheiro, 2017).

Há de se considerar ainda, a possibilidade de ocorrer polimorfismo decorrente de cruzamentos simpátricos e halopátricos nessa malacofauna introduzida com a existente nas áreas que sofreram intervenção (Portet et al., 2017, 2019).

Por serem animais pecilotermos, é previsível que diversos fatores limitantes geológicos e climáticos exerçam uma razoável influência nas densidades populacionais. Em condições experimentais ocorre uma alteração da capacidade reprodutiva devido ao isolamento das colônias, sendo assim a produção de um número de indivíduos em coletivo independe daquelas para a sobrevivência individual. As observações indicam que o potencial reprodutivo é excepcional, pelo menos nesta espécie transmissora de *S. mansoni* (Teles et al., 2005; Carvalho; Coelho; Lenzi, 2008).

O estabelecimento dos focos impõe a contaminação do ambiente com fezes por períodos longos para o desenvolvimento da susceptibilidade, até o ponto que pequenas quantidades de ovos são suficientes para a manutenção da transmissão (Carvalho; Coelho; Lenzi, 2008). Todos estes fatores contribuem para ambientação da fauna límnic, dentre eles, do hospedeiro intermediário predisposto a *S. mansoni* incrementando o risco de dispersão desta doença (Baeninger, 2005).

O rápido processo de urbanização ocorrido na região sudeste no início do século XX ocasionou um crescimento desordenado do município de Ourinhos, no Vale do Paranapanema. Palasio et al. (2019) apontaram a presença de *B. glabrata* nesse município, além de casos autóctones de esquistossomose no período de 2008 a 2010, de acordo com o CVE (Centro de Vigilância Epidemiológica, SP, Brasil).

Logo, a formação de malacofaunas favoráveis à transmissão e disseminação da esquistossomose mansoni no nosso país e no mundo, é um fator que

compromete a qualidade das coleções hídras para as populações, principalmente, àquelas desprovidas de demais recursos que lhe garantam uma sobrevivência digna.

O desenvolvimento de técnicas sensíveis e específicas para o diagnóstico molecular no hospedeiro intermediário infectado por *S. mansoni*, pode preencher uma lacuna da vigilância, por fomentar a detecção precoce do ciclo desse helminto e por reconhecer novos focos endêmicos (Pinheiro, 2017).

A região cefalopodal foi eleita como a melhor para esse trabalho, pois, é onde ocorre o primeiro contato parasitário com início da multiplicação das células germinativas e diferenciação em esporocisto primário (Carvalho; Coelho; Lenzi, 2008; Neves, 2002; Guaraldo et al., 1981).

Para extração de DNA genômico de *S. mansoni*, a partir dos cefalópodes dos caramujos infectados, utilizou-se o QIAamp® DNA MiniKit, e os resultados apontaram uma positividade na padronização dos ensaios qPCR e cPCR. Por outro lado, a visualização das bandas não estava tão evidente quando a da sequência 28S do DNA com 395 pb, apresentando também marcações inespecíficas em 2% de agarose gel, o que nos levou a concluir que para o diagnóstico da infecção por cPCR, a sequência 28S seria a mais indicada, sendo, portanto, utilizada nos ensaios posteriores.

De acordo com, Jannotti-Passos et al. (2006) houve a identificação molecular do parasita utilizando como ferramenta a sequência espécie-específica em *tandem* do DNAm de *S. mansoni* em *B. glabrata* infectado nos ensaios de Multiplex-PCR. Isto aponta para uma seletividade e especificidade deste marcador na identificação prévia deste molusco infectado.

Dessa forma, considerando o protocolo anteriormente padronizado no diagnóstico da infecção de soro humano por *TaqMan*® qPCR (Espírito-Santo et al., 2014), propôs-se expandir a técnica e aprofundar os estudos dessa sequência no diagnóstico do hospedeiro intermediário infectado.

O LAMP PCR foi proposto recentemente em estudo similar e apresentou resultados que podem torná-lo uma alternativa no diagnóstico qualitativo de molusco infectado sem que seja necessário o uso de termociclador (Caldeira; Jannotti-Passos; Santos Carvalho, 2017; Gandasegui et al., 2016, 2018; Jannotti-Passos et al., 2006; Hamburger et al., 2017).

Todavia, a *TaMan® qPCR* é outra alternativa que demonstra ser interessante quando se deseja uma análise quantitativa que forneça também informações referentes à intensidade da infecção nessa região. Contém ainda, um controle interno da reação de PCR, que avalia a presença de inibidores da amplificação do DNA genômico melhorando a especificidade e sensibilidade dessa técnica (Espírito-Santo et al., 2014; Gomes et al., 2009; ten Hove et al., 2008).

Assim, representa uma inovação, uma vez que, a nested PCR e outras técnicas moleculares anteriormente analisadas tem como desvantagens um aumento da possibilidade de contaminação, ou a falta de um controle interno da reação (Janotti-Passos et al., 1997; Gandasegui et al., 2016; Caldeira; Jannotti-Passos; Santos Carvalho, 2017).

Como limitação, para indicação deste método na análise de caramujos coletados diretamente do campo, sugere-se que exista um resultado mais apurado com a realização de testes de especificidade da sequência 28S para *S. mansoni*, considerando a possibilidade de existir outras larvas de trematódeo que também podem infectar *B. glabrata* em campo, apesar da descrição já existente em relação à especificidade para *S. mansoni* quando realizado ensaios junto com *Cercária caratinguensis* (Guaraldo et al., 1981; Ohlweiler e Kawano, 2002; Simões et al., 2017; Pinaud et al., 2019).

Para as análises entre as duas linhagens 72 horas e 14 dias após exposição ao miracídios, as técnicas de tecnologia molecular utilizadas, foram capazes de identificar bandas nítidas na reação de cPCR, bem como a presença do DNA genômico nos resultados expressos em Ct (*Cycle Threshold*), inclusive em caramujos expostos à uma baixa carga parasitária. Por outro lado, a positividade das amostras ocorreu de forma aleatória, ao invés de seguir um padrão esperado de uma curva dose-resposta crescente.

Dentre os fatores que podem explicar essa variação na positividade das amostras, considera-se que esses moluscos foram expostos a condições anti-naturais estressantes durante a coleta e transporte dos exemplares ao ambiente laboratorial (LIM-06).

Cantinha (2012) apontou que fatores epigenéticos, podem ser desencadeados pelo stress e que, talvez se relacionem ao impacto na susceptibilidade. Esse fato restringe a variabilidade genética na produção de seus descendentes, que é

determinante para perpetuação de indivíduos resistentes e sobreviventes ao parasito (Lima et al., 2019).

Outro fator que justificaria essa variação conforme a intensidade da carga parasitária, seria o mecanismo de regulação interna desse hospedeiro intermediário, diante de uma possível inibição do desenvolvimento descomedido de parasitas intra-molusco, quando expostos à alta quantidade de miracídios (Carvalho; Coelho; Lenzi, 2008; Mitta et al., 2012; Wheeler et al., 2018).

Assim, para uma melhor comparação com relação à variação dos resultados da susceptibilidade desses dois grupos na infecção por *S. mansoni*, outros experimentos utilizando linhagens isogênicas da criação experimental de *B. glabrata* do córrego Christoni, seriam necessários (Gomes et al., 2009; Pinaud et al., 2019; Portet et al., 2017, 2019; Tennessen et al., 2015).

Outro resultado a ser acatado diz respeito à capacidade de infecção com *S. mansoni* (BH) em caramujos retirados de Ourinhos, que foi constatada pela liberação de cercárias, e pela infecção do hospedeiro definitivo (hamster/*Mesocricetus auratus*) demonstrada pela positividade da técnica de Kato-Katz (Bio-manguinhos, Fiocruz 2014) (120 ovos por grama de fezes após 43 dias de infecção) desses animais associado aos achados anatomopatológicos compatíveis com a infecção pelo *S. mansoni* nos órgãos dos hamsters eutanasiados.

Não foram encontrados ovos nas fezes do grupo de animais infectados com cercárias proveniente dos caramujos controle positivo do ciclo. Entretanto, percebeu-se, analisando estudos anteriores, que a oviposição no ciclo rotineiro estabelecido em laboratório com caramujos BH pode ocorrer mais tardiamente (Espírito-Santo et al., 2014).

Ainda, para completar a evidência de perpetuação do ciclo, a análise histopatológica deste estudo seguiu a mesma metodologia do trabalho desenvolvido por Espírito-Santo et al. (2014).

Foram observadas alterações anatomopatológicas em ambos os grupos de animais estudados, como a presença de hepatoesplenomegalia na análise macroscópica, e infiltrados inflamatórios em torno de ovos e vermes adultos na análise microscópica, bem como, granulomas esquistossomóticos no fígado, pulmão e intestino, além da congestão esplênica.

Esses achados culminaram nos processos de fibrose periportal e pneumonite esquistossomótica, confirmando a morbidade da infecção experimental de hamsters,

pelas cercárias liberadas do hospedeiro intermediário da linhagem Ourinhos (Butrous, 2019; Espírito-Santo et al., 2015).

Assim sendo, esse trabalho, formou um novo ciclo experimental, com uma reprodução considerável e apontou um avanço na observação do comportamento da relação parasito-hospedeiro da esquistossomose.

Apesar da existência de restrições nas condições de um ciclo laboratorial, apontamos pela primeira vez a *TaqMan® qPCR* como uma alternativa para o diagnóstico de caramujos infectados por *S. mansoni* numa região de baixa endemicidade do Estado de São Paulo.

A presença de alterações anatomopatológicas nos órgãos do hamster infectado demonstrou a capacidade que esse molusco tem de completar o ciclo assexuado e, da cercária liberada pelo mesmo de completar o ciclo sexuado no hamster, inclusive desencadeando a doença na forma hepatoesplênica grave.

Avançar na observação do comportamento da relação parasito-hospedeiro dessa parasitose torna-se, não só importante, como também contemporâneo e inovador, sendo uma ação destacada pela Assembleia Mundial de Saúde de 2012 (Pellegrini, 2012) e pelo PCE (Brasil, 2008).

Trata-se, portanto, de um estudo que aponta para uma ferramenta diagnóstica molecular mais sensível e específica que a utilizada nos procedimentos padrões de vigilância malacológica. Com isso, pode-se aprimorar o diagnóstico da infecção por *S. mansoni* no hospedeiro intermediário, que constitui a fase pré-patente da infecção no homem e em outros mamíferos. Nesse contexto, poderá promover o monitoramento e a gestão das coleções hídricas nas áreas endêmicas, principalmente nas de moderada e baixa endemicidade da esquistossomose, melhorando o impacto dessa parasitose na qualidade de vida dessas populações.

8 CONCLUSÕES

- Desenvolveu-se e padronizou-se as técnicas de cPCR e qPCR, sensíveis e específicas para detectar a infecção por *S. mansoni* em caramujos *B. glabrata* procedentes de área de baixa endemicidade;
- As condições estabelecidas no nosso experimento favoreceram o desenvolvimento da linhagem experimental *B. glabrata*, Ourinhos/SP, no LIM-06;
- A presença de alterações anatomopatológicas nos órgãos do hamster infectado demonstrou a capacidade que esse molusco tem de completar o ciclo assexuado no hospedeiro intermediário e, da cercária liberada pelo mesmo de completar o ciclo sexuado no hospedeiro definitivo, inclusive desencadeando a doença na forma hepatoesplênica grave;
- A extração de DNA genômico de *S. mansoni* foi efetiva e os *primers* utilizados apresentaram sensibilidade e especificidade na detecção do DNA genômico de *S. mansoni*, em *B. glabrata* linhagem Ourinhos/SP e BH;
- A detecção de esporocistos primários de *S. mansoni* em *B. glabrata* foi obtida tanto após 72 horas, quanto após 14 dias da exposição ao miracídios, sendo constatada pela presença de bandas nítidas com 350 pb na reação de cPCR, além de produtos de amplificação do DNA de *S. mansoni* na *TaqMan®qPCR* expressos em Ct (*Cycle Threshold*).

9 PROPOSTA

Apresentamos como proposta de melhoria à Vigilância Malacológica da Esquistossomose mansoni a utilização do método tradicional, das técnicas moleculares e/ou a combinação de métodos, seguindo o algoritmo abaixo:

Figura 34 - Algoritmo sugerido para aprimoramento dos procedimentos rotineiros na vigilância malacológica empregada para monitoramento de áreas de transmissão da esquistossomose mansoni

Fonte: Arquivo Pessoal (2019).

REFERÊNCIAS¹

- Abbasi I, King CH, Muchiri EM, Hamburger J. Detection of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium* DNA by loop-mediated isothermal amplification: identification of infected snails from early prepatency. *Am J Trop Med Hyg*. 2010;83(2):427-32.
- Baeninger R. (2005). São Paulo e suas migrações no final do século 20. São Paulo em Perspectiva. 2005;19(3):84-96.
- Barbosa FS. Tópicos em malacologia médica. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1995. 314 p.
- Barretto AC, Castro CN, Marsden PP. Moluscos vectores da esquistossomose mansônica no lado leste do Rio São Francisco, no Estado da Bahia. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1981;14(1):99-103.
- Bezerra FSM, Pinheiro MCC, Silva Filho JD, Castro IMN, Caldeira RL, Sousa MS et al. Identification of *Biomphalaria* sp. and other freshwater snails in the large-scale water transposition project in the Northeast of Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2018;60:e41.
- Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Observatório de Clima e Saúde. Laboratório de Informação em Saúde. Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica em Saúde. Nota técnica: Avaliação dos impactos sobre a saúde do desastre da mineração da Vale (Brumadinho, MG). Brasília: Ministério da Saúde, 2019. 16 p.
- 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). 2ª ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2008. 178 p.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Doenças Transmissíveis. Plano integrado de ações estratégicas de eliminação da hanseníase, filariose, esquistossomose e oncocercose como problema de saúde pública, tracoma como causa de cegueira e controle das geohelmintíases: plano de ação 2011-2015. Brasília: Ministério da Saúde, 2013. 100 p.
- Butrous G. Schistosome infection and its effect on pulmonary circulation. *Glob Cardiol Sci Pract*. 2019;2019(1):5.
- Caldeira RL, Jannotti-Passos LK, Santos Carvalho O. Use of Molecular Methods for the Rapid Mass Detection of *Schistosoma mansoni* (Platyhelminthes: Trematoda) in *Biomphalaria* spp. (Gastropoda: Planorbidae). *J Trop Med*. 2017; 2017.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Cantinha RS. Estudo da resposta do caramujo *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) frente a estímulos ambientais estressores, com enfoque na proteína HSP70 [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares; 2012.

Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HL. *Schistosoma mansoni* & Esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 2008. 1124p.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention.
<https://www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/biology.htm> (acesso em 24/07/2019).

CVE. Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac".
<http://www.saude.sp.gov.br/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica-prof.-alexandre-vranjac/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-hidrica-e-alimentar/documentos-tecnicos/esquistossomose> (acesso em 24/07/2019).

Chieffi PP, Waldman EA. Aspectos particulares do comportamento epidemiológico da esquistossomose mansônica no Estado de São Paulo, Brasil. *Cad Saúde Pública*. 1988;4(3):257-75.

Durand P, Sire C, Théron A. Isolation of microsatellite markers in the digenetic trematode *Schistosoma mansoni* from Guadeloupe island. *Mol Ecol*. 2000;9(7):997-8.

Enk MJ, Oliveira ESG, Rodrigues NB. A salting out and resin procedure for extracting *Schistosoma mansoni* DNA from human urine samples. *BMC Res Notes*. 2010;3:115.

Espírito-Santo MCC, Alvarado-Mora MV, Pinto PL, de Brito T, Botelho-Lima L, Heath AR et al. Detection of *Schistosoma mansoni* infection by TaqMan® Real-Time PCR in a hamster model. *Exp Parasitol*. 2014;143:83-9.

Espírito-Santo MCC, Alvarado-Mora MV, Pinto PLS, Carrilho FJ, Pinho JRR, Gryscek RCB. Two sequential PCR amplifications for detection of *Schistosoma mansoni* in stool samples with low parasite load. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2012;54(5):245-8.

Espírito-Santo MCC. Estudo comparativo da acurácia de diferentes técnicas para o diagnóstico laboratorial da esquistossomose mansoni em áreas de baixa endemicidade [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2013.

Ferreira JM, Meira JA. Três casos de esquistossomose mansoni procedentes do interior do Estado de São Paulo (Ourinhos, Palmital e Ipauçu). Foco autóctone na cidade de Ourinhos. *Rev Paul Med*. 1952;41(1):15-8.

Freitas CA. Situação atual da esquistossomose no Brasil. *Rev Bras Malariol Doencas Trop*. 1972;24:03-63.

Gandasegui J, Fernández-Soto P, Hernández-Goenaga J, López-Abán J, Vicente B, Muro A. Biompha-LAMP: A New Rapid Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Detecting *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata* Snail Host. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(12):e0005225.

Gandasegui J, Fernández-Soto P, Muro A, Simões Barbosa C, Lopes de Melo F, Loyo R et al. A field survey using LAMP assay for detection of *Schistosoma mansoni* in a low-transmission area of schistosomiasis in Umbuzeiro, Brazil: Assessment in human and snail samples. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12(3):e0006314.

Gomes LI, Marques LHS, Enk MJ, Coelho PMZ, Rabello A. Further evaluation of an updated PCR assay for the detection of *Schistosoma mansoni* DNA in human stool samples. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104(8):1194-6.

Guaraldo AMA, Magalhães LA, Rangel HA, Pareja G. Evolução dos esporocistos de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 em *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) e *Biomphalaria tenagophila* (D'Orbigny, 1835). *Rev Saúde Pública*. 1981;15(4):436-48.

Hamburger J, He-Na, Xin XY, Ramzy RM, Jourdane J, Ruppel A. A polymerase chain reaction assay for detecting snails infected with bilharzia parasites (*Schistosoma mansoni*) from very early prepatency. *Am J Trop Med Hyg*. 1998;59(6):872-6.

Hamburger J, Turetski T, Kapeller I, Deresiewicz R. Highly repeated short DNA sequences in the genome of *Schistosoma mansoni* recognized by a species-specific probe. *Mol Biochem Parasitol*. 1991;44(1):73-80.

Han ZG, Brindley PJ, Wang SY, Chen Z. *Schistosoma* genomics: new perspectives on schistosome biology and host-parasite interaction. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2009;10:211-40.

Hanelt B, Adema CM, Mansour MH, Loker ES. Detection of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria* using nested PCR. *J Parasitol*. 1997;83(3):387-94.

Hassan M, El-Motaiem M, Afify H, Abaza B, El-Shafei M, Massoud AM. In vitro effect of Mirazid on *Schistosoma mansoni* worms. *J Egypt Soc Parasitol*. 2003;33(3):999-1008.

Jannotti-Passos LK, Magalhães KG, Carvalho OS, Vidigal TH. Multiplex PCR for both identification of Brazilian *Biomphalaria* species (Gastropoda: Planorbidae) and diagnosis of infection by *Schistosoma mansoni* (Trematoda: Schistosomatidae). *J Parasitol*. 2006;92(2):401-3.

Jannotti-Passos LK, Vidigal TH, Dias-Neto E, Pena SD, Simpson AJ, Dutra WO et al. PCR amplification of the mitochondrial DNA minisatellite region to detect *Schistosoma mansoni* infection in *Biomphalaria glabrata* snails. *J Parasitol*. 1997;83(3):395-9.

Kalinda C, Chimbari M, Mukaratirwa S. Implications of Changing Temperatures on the Growth, Fecundity and Survival of Intermediate Host Snails of Schistosomiasis: A Systematic Review. *Int J Environ Res Public Health*. 2017;14(1): 80.

Katz N, Almeida K. Esquistossomose, xistosa, barriga d'água. *Cienc Cult*. 2003;55(1):38-43.

King CH. The evolving schistosomiasis agenda 2007-2017-Why we are moving beyond morbidity control toward elimination of transmission. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(4):e0005517.

Laurenti A. E. M., Pirolí E. L. Aplicação do sensoriamento remoto e geoprocessamento para caracterização do uso e ocupação da terra em áreas de preservação permanente de nascentes, córregos e reservatórios na área urbana de Ourinhos nos anos de 1972 e 2006 – SP. *GeoAtos*. 2012;12(2):56-90

Le TH, Blair D, McManus DP. Mitochondrial DNA sequences of human schistosomes: the current status. *Int J Parasitol*. 2000;30(3):283-90.

Lima MG, Montresor LC, Pontes J, Augusto RC, da Silva JP, Thiengo SC. Compatibility Polymorphism Based on Long-Term Host-Parasite Relationships: Cross Talking Between *Biomphalaria glabrata* and the Trematode *Schistosoma mansoni* From Endemic Areas in Brazil. *Front Immunol*. 2019;10:328.

Magalhães LA, Dias LCS. Estudo da suscetibilidade da *Biomphalaria glabrata* de Ourinhos (SP), à infecção pelo *Schistosoma mansoni* de Belo Horizonte (MG), e de São José dos Campos (SP). *Rev Saúde Pública*. 1973;7(3):295-7.

McCreesh N, Arinaitwe M, Arineitwe W, Tukahebwa EM, Booth M. Effect of water temperature and population density on the population dynamics of *Schistosoma mansoni* intermediate host snails. *Parasit Vectors*. 2014;7:503.

Melo IFL. Levantamento da malacofauna límnic e helmintofauna associada aos moluscos dulcícolas do município de Nossa Senhora de Lourdes, Sergipe [dissertação]. Sergipe: Universidade Federal de Sergipe, Biologia Parasitária; 2018.
Menezes MJR, Carmo EH, Samico I. Avaliação do Sistema de Vigilância Epidemiológica da Esquistossomose em dois municípios do estado da Bahia, Brasil. *Epidemiol Serv Saúde*. 2012;21(2):213-22.

Mitta G, Adema CM, Gourbal B, Loker ES, Theron A. Compatibility polymorphism in snail/schistosome interactions: From field to theory to molecular mechanisms. *Dev Comp Immunol*. 2012;37(1):1-8.

Mitta G, Gourbal B, Grunau C, Knight M, Bridger JM, Théron A. The Compatibility Between *Biomphalaria glabrata* Snails and *Schistosoma mansoni*: An Increasingly Complex Puzzle. *Adv Parasitol*. 2017;97:111-45.

Neves DP editor. *Parasitologia Humana*. 11ª ed. São Paulo: Atheneu; 2005. 494p.

Ohlweiler FP, Kawano T. *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835) (Mollusca): adaptation to desiccation and susceptibility to infection with *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2002;44(4):191-201.

Palasio RGS, Bortoleto AN, Rosa-Xavier IG, Andrighetti MTM, Tuan R, Chiaravalloti-Neto F. Schistosomiasis in the Middle Paranapanema river region, state of São Paulo, Brazil: Does it matter today for public health? *Rev Soc Bras Med Trop*. 2019;52:e20180447.

Paraense WL. Estado atual da sistemática dos planorbídeos brasileiros (Mollusca, Gastropoda). *Arquivos do Museu Nacional* 1975; 55:105-28.

Pellegrini Filho A. A 65ª. Assembléia Mundial da Saúde discute os Determinantes Sociais da Saúde [Internet]. Rio de Janeiro: Portal DSS Brasil. 2012 Jun 11. Disponível em: <http://dssbr.org/site/?p=10499&preview=true>

Pinaud S, Portet A, Allienne JF, Belmudes L, Saint-Beat C, Arancibia N et al. Molecular characterisation of immunological memory following homologous or heterologous challenges in the schistosomiasis vector snail, *Biomphalaria glabrata*. *Dev Comp Immunol*. 2019; 92:238-52.

Pinheiro MCC. Ecoepidemiologia da esquistossomose mansoni em áreas da transposição do Rio São Francisco no estado do Ceará [tese]. Ceará: Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina; 2017.

Pontes LA, Dias-Neto E, Rabello A. Detection by polymerase chain reaction of *Schistosoma mansoni* DNA in human serum and feces. *Am J Trop Med Hyg*. 2002;66(2):157-62.

Portet A, Pinaud S, Chaparro C, Galinier R, Dheilly NM, Portela J et al. Sympatric versus allopatric evolutionary contexts shape differential immune response in *Biomphalaria* / *Schistosoma* interaction. *PLoS Pathog*. 2019;15(3):e1007647.

Portet A, Pinaud S, Tetreau G, Galinier R, Cosseau C, Duval D et al. Integrated multi-omic analyses in *Biomphalaria-Schistosoma* dialogue reveal the immunobiological significance of FREP-SmPoMuc interaction. *Dev Comp Immunol*. 2017; 75:16-27.

Rey L. Esquistossomíase mansônica: o parasito. In: Rey L. Bases da Parasitologia Médica. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2002. p. 153-82.

Roger E, Mitta G, Moné Y, Bouchut A, Rognon A, Grunau C et al. Molecular determinants of compatibility polymorphism in the *Biomphalaria glabrata*/*Schistosoma mansoni* model: new candidates identified by a global comparative proteomics approach. *Mol Biochem Parasitol*. 2008;157(2):205-16.

Sandland GJ, Josephson KA. Nutrient availability modulates both host and parasite life histories in a snail-trematode interaction. *Dis Aquat Organ*. 2017;126(2):135-42.

Sandoval N, Siles-Lucas M, Lopez Aban J, Pérez-Arellano JL, Gárate T, Muro A. *Schistosoma mansoni*: a diagnostic approach to detect acute schistosomiasis infection in a murine model by PCR. *Exp Parasitol*. 2006;114(2):84-8. 2006a

Sandoval N, Siles-Lucas M, Pérez-Arellano JL, Carranza C, Puente S, López-Abán J et al. A new PCR-based approach for the specific amplification of DNA from different *Schistosoma* species applicable to human urine samples. *Parasitology*. 2006;133(Pt 5):581-7. 2006b

Santana JV, Magalhães LA, Rangel HA. Seleção de linhagens de *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria glabrata* visando maior suscetibilidade ao *Schistosoma mansoni*. *Rev Saúde Pública*. 1978;12(1):67-77.

Simões LF, Bastos LDB, Camargo EAF, Neves MF, Linhares AX, Magalhães LA et al. Host-parasite relationship between *Biomphalaria amazonica* (Paraense, 1966) and *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907). *Braz J Biol*. 2017;77(2):340-6.

Simpson, A. J. G. et al. DNA polymorphism of schistosomes and their snail hosts. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 90: 211-213, 1995.

Sistema Integrado de Gerenciamento de Recursos Hídricos (SIGRH).
<http://www.sigrh.sp.gov.br/cbhmp/apresentacao> (acesso em 24/07/2019).

Steinauer ML, Blouin MS, Criscione CD. Applying evolutionary genetics to schistosome epidemiology. *Infect Genet Evol*. 2010;10(4):433-43.

Steinmann P, Keiser J, Bos R, Tanner M, Utzinger J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *Lancet Infect Dis*. 2006;6(7):411-25.

Teixeira CF. Otimização dos métodos de diagnóstico da esquistossomíase mansônica em áreas de baixa endemicidade [tese]. Rio Grande do Sul: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Faculdade de Biociências; 2011.

Teles, H. M S. Distribuição geográfica das espécies dos caramujos transmissores de *Schistosoma mansoni* no Estado de São Paulo. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 38:426-432,2005.

ten Hove RJ, Verweij JJ, Vereecken K, Polman K, Dieye L, van Lieshout L. Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* infection in stool samples collected in northern Senegal. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2008;102(2):179-85.

Tennessen JA, Bonner KM, Bollmann SR, Johnstun JA, Yeh JY, Marine M et al. Genome-Wide Scan and Test of Candidate Genes in the Snail *Biomphalaria glabrata* Reveal New Locus Influencing Resistance to *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(9):e0004077.

Theron A, Rognon A, Gourbal B, Mitta G. Multi-parasite host susceptibility and multi-host parasite infectivity: a new approach of the *Biomphalaria glabrata*/*Schistosoma mansoni* compatibility polymorphism. *Infect Genet Evol.* 2014; 26:80-8.

Toor J, Alsallaq R, Truscott JE, Turner HC, Werkman M, Gurarie D et al. Are We on Our Way to Achieving the 2020 Goals for Schistosomiasis Morbidity Control Using Current World Health Organization Guidelines? *Clin Infect Dis.* 2018;66(4):S245-52.

Tuan R. Distribuição e diversidade de espécies do gênero *Biomphalaria* em microrregiões localizadas no Médio Paranapanema, São Paulo, SP, Brasil. *Biota Neotrop.* 2009;9(1).

Watson, J. M. *Medical Helminthology*. London: Baillière Tindall and Cox, 1960.

Wheeler NJ, Dinguirard N, Marquez J, Gonzalez A, Zamanian M, Yoshino TP et al. Sequence and structural variation in the genome of the *Biomphalaria glabrata* embryonic (Bge) cell line. *Parasit Vectors.* 2018;11(1):496.

Wichmann D, Panning M, Quack T, Kramme S, Burchard GD, Grevelding C et al. Diagnosing schistosomiasis by detection of cell-free parasite DNA in human plasma. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009;3(4):e422.

World Health Organization. Elimination of schistosomiasis from low-transmission areas: report of a WHO informal consultation, Salvador, Bahia, Brazil, 18-19 August 2008. Geneva: World Health Organization; 2009.

World Health Organization. Schistosomiasis and soil-transmitted helminthiases: number of people treated in 2015. *Weekly epidemiological record*. Geneva: World Health Organization; 2016.

Xu J, Rong R, Zhang HQ, Shi CJ, Zhu XQ, Xia CM. Sensitive and rapid detection of *Schistosoma japonicum* DNA by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Int J Parasitol.* 2010;40(3):327-31.

Zhang SM, Bu L, Laidemitt M, Lu L, Mutuku M, Mkoji G et al. Complete mitochondrial and rDNA complex sequences of important vector species of *Biomphalaria*, obligatory hosts of the human-infecting blood fluke, *Schistosoma mansoni*. *Scientific Reports.* 2018;8.

Zheng J, Gu XG, Xu YL, Ge JH, Yang XX, He CH et al. Relationship between the transmission of schistosomiasis japonica and the construction of the Three Gorge Reservoir. *Acta Trop.* 2002;82(2):147-56.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Resultados dos experimentos de cPCR na amplificação do DNA de *S. manson*i em caramujos *B. glabrata* linhagem Ourinhos e BH/IMT com 1 miracídios e 72 horas de infecção

1 miracídios 72 horas	Amostra	Resultado da cPCR	1 miracídios 72 horas	Amostra	Resultado da cPCR
1	Ce1_O72_1*	Negativo	12	Ce1_BH72_1**	Negativo
2	Ce2_O72_1	Negativo	13	Ce2_BH72_1	Negativo
3	Ce3_O72_1	Positivo	14	Ce3_BH72_1	Negativo
4	Ce4_O72_1	Negativo	15	Ce4_BH72_1	Negativo
5	Ce5_O72_1	Negativo	16	Ce5_BH72_1	Negativo
6	Ce6_O72_1	Negativo	17	Ce6_BH72_1	Negativo
7	Ce7_O72_1	Negativo	18	Ce7_BH72_1	Negativo
8	Ce8_O72_1	Negativo	19	Ce8_BH72_1	Negativo
9	Ce9_O72_1	Negativo	20	Ce9_BH72_1	Negativo
10	Ce10_O72_1	Negativo	21	Ce10_BH72_1	Negativo

APÊNDICE B - Resultados dos experimentos de cPCR na amplificação do DNA de *S. mansoni* em caramujos *B. glabrata* linhagem Ourinhos e BH/IMT com 1 miracídeos e 14 dias de infecção

1 miracídeos 14 dias	Amostra	Resultado da PCR	1 miracídeos 14 dias	Amostra	Resultado da PCR
1	Ce1_O14_1	Negativo	12	Ce2_BH14_1	Negativo
2	Ce2_O14_1	Negativo	13	Ce3_BH14_1	Negativo
3	Ce3_O14_1	Negativo	14	Ce4_BH14_1	Negativo
4	Ce4_O14_1	Negativo	15	Ce5_BH14_1	Negativo
5	Ce5_O14_1	Negativo	16	Ce6_BH14_1	Negativo
6	Ce6_O14_1	Negativo	17	Ce7_BH14_1	Negativo
7	Ce7_O14_1	Negativo	18	Ce8_BH14_1	Negativo
8	Ce8_O14_1	Negativo	19	Ce9_BH14_1	Negativo
9	Ce9_O14_1	Negativo	20	Ce10_BH14_1	Negativo
10	CN	Negativo	21	CP_V2	Positivo
11	Ce1_BH14_1	Negativo	22	CP_V3	Positivo

APÊNDICE C - Resultados dos experimentos de cPCR na amplificação do DNA de *S. mansoni* em caramujos *B. glabrata* linhagem Ourinhos e BH/IMT com 5 miracídios 72 horas dias de infecção

5 miracídios 72 horas	Amostra	Resultado da PCR	5 miracídios 72 horas	Amostra	Resultado da PCR
1	Ce1_O72_5	Negativo	12	Ce1_BH72_5	Negativo
2	Ce2_O72_5	Negativo	13	Ce2_BH72_5	Negativo
3	Ce3_O72_5	Negativo	14	Ce3_BH72_5	Negativo
4	Ce4_O72_5	Negativo	15	Ce4_BH72_5	Negativo
5	Ce5_O72_5	Negativo	16	Ce5_BH72_5	Negativo
6	Ce6_O72_5	Negativo	17	Ce6_BH72_5	Negativo
7	Ce7_O72_5	Negativo	18	Ce7_BH72_5	Negativo
8	Ce8_O72_5	Negativo	19	Ce8_BH72_5	Negativo
9	Ce9_O72_5	Negativo	20	Ce9_BH72_5	Negativo
10	Ce10_O72_5	Positivo	21	Ce10_BH72_5	Negativo
11	CN	Negativo	22	CP_V2	Positivo

APÊNDICE D - Resultados dos experimentos de cPCR na amplificação do DNA de *S. mansoni* em caramujos *B. glabrata* linhagem Ourinhos e BH/IMT com 14 dias de infecção e 5 miracídios

5 miracídios 14 dias	Amostra	Resultado da PCR	5 miracídios 14 dias	Amostra	Resultado da PCR
1	Ce1_O14_5	Positivo	12	Ce2_BH14_5	Negativo
2	Ce2_O14_5	Negativo	13	Ce3_BH14_5	Negativo
3	Ce3_O14_5	Positivo	14	Ce4_BH14_5	Negativo
4	Ce4_O14_5	Negativo	15	Ce5_BH14_5	Negativo
5	Ce5_O14_5	Negativo	16	Ce6_BH14_5	Negativo
6	Ce6_O14_5	Positivo	17	Ce7_BH14_5	Negativo
7	Ce7_O14_5	Positivo	18	Ce8_BH14_5	Positivo
8	Ce8_O14_5	Positivo	19	Ce9_BH14_5	Negativo
9	Ce9_O14_5	Positivo	20	Ce10_BH14_5	Positivo
10	CN	Negativo	21	CP_V2	Negativo
11	Ce1_BH14_5	Negativo	-	-	-

APÊNDICE E - Resultados dos experimentos de cPCR na amplificação do DNA de *S. mansoni* em caramujos *B. glabrata* linhagem Ourinhos e BH/IMT com 72 horas de infecção, com exposição à dez miracídios

10 miracídios 72 horas	Amostra	Resultado da PCR	10 miracídios 72 horas	Amostra	Resultado da PCR
1	Ce1_O72_10	Positivo	12	Ce1_BH72_10	Negativo
2	Ce2_O72_10	Positivo	13	Ce2_BH72_10	Positivo
3	Ce3_O72_10	Positivo	14	Ce3_BH72_10	Negativo
4	Ce4_O72_10	Negativo	15	Ce4_BH72_10	Positivo
5	Ce5_O72_10	Positivo	16	Ce5_BH72_10	Positivo
6	Ce6_O72_10	Positivo	17	Ce6_BH72_10	Positivo
7	Ce7_O72_10	Negativo	18	Ce7_BH72_10	Positivo
8	Ce8_O72_10	Positivo	19	Ce8_BH72_10	Negativo
9	Ce9_O72_10	Negativo	20	Ce9_BH72_10	Negativo
10	Ce10_O72_10	Negativo	21	Ce10_BH72_10	Positivo
11	CN	Negativo	22	CP_V2	Positivo

APÊNDICE F - Resultados dos experimentos de cPCR na amplificação do DNA de *S. mansoni* em caramujos *B. glabrata* linhagem Ourinhos e BH/IMT com 14 dias de infecção, com exposição à dez miracídios

10 miracídios 14 dias	Amostra	Resultado da PCR	10 miracídios 14 dias	Amostra	Resultado da PCR
1	Ce1_O14_10	Positivo	12	Ce7_BH14_10	Negativo
2	Ce2_O14_10	Positivo	13	Ce8_BH14_10	Negativo
3	Ce3_O14_10	Positivo	14	Ce9_BH14_10	Negativo
4	Ce4_O14_10	Positivo	15	Ce10_BH14_10	Negativo
5	CN	Negativo	16	CP_V2	Positivo
6	Ce1_BH14_10	Negativo	-	-	-
7	Ce2_BH14_10	Negativo	-	-	-
8	Ce3_BH14_10	Negativo	-	-	-
9	Ce4_BH14_10	Negativo	-	-	-
10	Ce5_BH14_10	Positivo	-	-	-
11	Ce6_BH14_10	Positivo	-	-	-

APÊNDICE G - Resultados dos experimentos de cPCR na amplificação do DNA de *S. mansoni* em caramujos *B. glabrata* linhagem Ourinhos e BH/IMT com 72h de infecção, com exposição à 20 miracídios

20 miracídios 72 horas	Amostra	Resultado da PCR	20 miracídios 72 horas	Amostra	Resultado da PCR
1	Ce1_O72_20	Positivo	12	Ce1_BH72_20	Positivo
2	Ce2_O72_20	Positivo	13	Ce2_BH72_20	Positivo
3	Ce3_O72_20	Positivo	14	Ce3_BH72_20	Negativo
4	Ce4_O72_20	Positivo	15	Ce4_BH72_20	Positivo
5	Ce5_O72_20	Positivo	16	Ce5_BH72_20	Negativo
6	Ce6_O72_20	Positivo	-	Ce6_BH72_20	Positivo
7	Ce7_O72_20	Positivo	-	Ce7_BH72_20	Positivo
8	Ce8_O72_20	Negativo	-	Ce8_BH72_20	Negativo
9	Ce9_O72_20	Negativo	-	Ce9_BH72_20	Positivo
10	Ce10_O72_20	Negativo	-	Ce10_BH72_20	Positivo
11	CN	Negativo	-	CP_V2	Positivo

APÊNDICE H - Resultados dos experimentos de cPCR na amplificação do DNA de *S. mansoni* em caramujos *B. glabrata* linhagem Ourinhos e BH/IMT com 14 dias de infecção, com exposição à 30 miracídios

30 miracídios 14 dias	Amostra	Resultado da PCR	30 miracídios 14 dias	Amostra	Resultado da PCR
1	Ce1_O14_30	Negativo	12	Ce6_BH14_30	Positivo
2	Ce2_O14_30	Negativo	13	Ce7_BH14_30	Positivo
3	Ce3_O14_30	Positivo	14	Ce8_BH14_30	Positivo
4	Ce4_O14_30	Positivo	15	Ce9_BH14_30	Positivo
5	Ce5_O14_30	Positivo	16	Ce10_BH14_30	Positivo
6	CN	Negativo	17-	CP_V2	Positivo
7	Ce1_BH14_30	Positivo	-	-	-
8	Ce2_BH14_30	Positivo	-	-	-
9	Ce3_BH14_30	Positivo	-	-	-
10	Ce4_BH14_30	Positivo	-	-	-
11	Ce5_BH14_30	Positivo	-	-	-

APÊNDICE I - Resultados das qPCR e cPCR obtidos de amostras positivas de moluscos infectados com 10 miracídeos, 72 horas de infecção, com diferentes iniciadores

Caramujos Ourinhos	RT-PCR ten Hove (ct)	RT-PCR ES/Pontes	PCR convencional Sandoval
Ce1_O72_10	29,7	23,7	Positivo
Ce2_O72_10	29,5	23,8	Positivo
Ce3_O72_10	31,4	24,6	Positivo
Ce4_O72_10	Undetermined	Undetermined	Negativo
Ce5_O72_10	30,5	24,3	Positivo
Ce6_O72_10	32,8	26,0	Positivo
Ce7_O72_10	Undetermined	Undetermined	Negativo
Ce8_O72_10	31,1	24,8	Positivo
Ce9_O72_10	Undetermined	Undetermined	Negativo
Ce10_O72_10	Undetermined	Undetermined	Negativo
Ce1_O14_10	25,9	19,3	Positivo
Ce2_O14_10	25,0	18,8	Positivo
Ce3_O14_10	25,9	19,9	Positivo
Ce4_O14_10	24,8	19,0	Positivo
Ce5_O14_10	Morreram		
Ce6_O14_10			
Ce7_O14_10			
Ce8_O14_10			
Ce9_O14_10			
Ce10_O14_10			

APÊNDICE J - Resultado dos Ct's (*Cycle Threshold*) da qPCR obtida de amostras positivas de moluscos infectados com 10 miracídeos, 72 horas de infecção, utilizando o iniciador ten Hove et al., 2008

APÊNDICE K - Resultado dos Ct's (*Cycle Threshold*) da qPCR obtida de amostras positivas de moluscos infectados com 10 miracídeos, 72 horas de infecção, utilizando o iniciador Pontes; Dias-Neto e Rabello et al., 2002 e sonda Espírito-Santo, 2013

APÊNDICE L - Taxa de incidência de esquistossomose na região Sudeste do Brasil

Fonte: Atlas da água, ICICT/Fiocruz, 2018 (www.aguabrasil.ict.fiocruz.br).

APÊNDICE M - Aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada **“Manutenção do Ciclo Biológico de Schistosoma mansoni em Hamsters (linhagem Golden) experimentalmente infectados”**, registrada com o nº **1012/2018**, sob a responsabilidade de **Maria Cristina Carvalho do Espírito Santo e Marcia Oliveira Casotti**, apresentada pelo Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada “Ad Referendum” pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em 14.03.18

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 02-02-2017 Término: 19-07-2019
Espécie/linhagem/raça	Hamster Golden
Nº de animais	312
Peso/Idade	5 semanas
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Instituto de Medicina Tropical

A CEUA FMUSP solicita que ao final da pesquisa seja enviado Relatório com todas as atividades.

CEUA-FMUSP, 14 de Março de 2018

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

ATIVIDADES ACADÊMICAS

1. Marcia Oliveira Casotti, Roseli Tuan, Michele Gomes, Emmanuel Dias-Neto, João Renato Rebello Pinho, Fabiana Martins Paula, Flair José Carrilho José Carrilho, Expedito José Albuquerque Luna, Ronaldo Cesar Borges Gryscek, Maria Cristina Carvalho do Espírito-Santo. **Molecular characterization of the larval phase of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata* mollusks in experimental conditions.** ASTMH 65th Annual Meeting November 13-17, 2016, Atlanta Marriott Marquis and Hilton Atlanta, Georgia, USA. As a congressman and poster presentation of the abstract: Original Abstract Number: 1424.New Presentation Number: 571. **(A*)**
2. Márcia Oliveira Casotti; Maria Cristina Carvalho do Espírito Santo. **Diagnóstico da infecção de *Biomphalaria glabrata* por *Schistosoma mansoni* em área de baixa endemicidade, no estado de São Paulo, pela detecção de esporocistos primários, utilizando técnicas de biologia molecular.** V Jornada Científica da Divisão/Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias. FMUSP, 23.08.17. **(B*)**
3. Marcia Oliveira Casotti and Maria Cristina Carvalho do Espírito Santo. **Molecular detection of *Schistosoma mansoni* sporocyst stage in *Biomphalaria glabrata* mollusk in experimental conditions.** XXV Congresso Brasileiro de Parasitologia, 03 a 06 de setembro de 2017, Búzios, Rio de Janeiro. Brazil. **(C*)**
4. Márcia Oliveira Casotti, Roseli Tuan, Michele Gomes, Expedito José Albuquerque Luna, Emmanuel Dias-Neto, Fabiana Martins Paula, João Renato Rebello Pinho, Flair José Carrilho, Ronaldo Cesar Borges Gryscek, Maria Cristina Carvalho do Espírito-Santo. **Detection of *Schistosoma mansoni* sporocyst stage in *Biomphalaria glabrata* mollusk in experimental conditions.** American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 67th Annual Meeting October 28 - November 1, 2018, Sheraton New Orleans and New Orleans Marriott, New Orleans, LA USA. **(D*)**

*A:

diagnostic assay for opisthorchiasis with the goal of reducing morbidity and mortality.

571

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF THE LARVAL PHASE OF SCHISTOSOMA MANSONI IN BIOMPHALARIA GLABRATA MOLLUSKS UNDER EXPERIMENTAL CONDITIONS

Marcia Oliveira Casotti¹, Roseli Tain Tuani¹, Micheli Gomes¹, Emmanuel Din-Nesro¹, João Renato Rebelo Pinho¹, Fabiana Martins Paula¹, Flair José Camilo José Camillo¹, Expedito José Albuquerque Lima¹, Ronaldo Cesar Borges Borges Grydtek¹, Maria Cristina Espirito-Santo²

¹Superintendência de Controle de Endemias (SUCE), São Paulo, Brazil; ²Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil; ³Instituto de Medicina Tropical, São Paulo, Brazil; ⁴Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo; ⁵Centro Universitário Fundação Oswaldo Almeida, Rio de Janeiro, Brazil

Schistosomiasis mansoni affects approximately 207 million people in the world. In Brazil, a major goal of the Control Program for this parasite is to reduce the risk of geographic expansion. The main intermediate host of *Schistosoma mansoni* is *Biomphalaria glabrata*. The detection of larval stages in intermediate hosts is an important challenge to public health since it can indicate early natural infections rates. The objective of this study is to standardize the detection of *S. mansoni* from primary sporocysts developed in *B. glabrata* mollusks tissue artificially infected with Belo Horizonte *S. mansoni* lineage, using the Polymerase Chain Reaction (PCR), a Two Sequential PCR-amplification (the PCR) and TaqMan[®] Real-Time PCR system (qPCR). Twenty *B. glabrata* mollusks were infected with thirty miracidia obtained from a laboratory cycle of *S. mansoni*. For *S. mansoni* DNA extraction, after thirty days, four daughter-sporocysts were collected. Moreover, the head-foot portion was removed from four additional specimens of *B. glabrata*. The nucleic acid was extracted using the QIAeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen). Extracted DNA was quantified using Nanodrop and amplified with the three molecular techniques cited above, using primers that amplify 121bp *S. mansoni* DNA tandem sequences. The amplification product was detected in agarose gel 2%. The extraction process of daughter-sporocysts yielded around 6.1 ng/μl of *S. mansoni* DNA. The amplification products of qPCR were faint, but the results were better after Re-PCR and qPCR, which showed a mean of 20.07 Cycle Threshold (Ct). *S. mansoni* DNA extraction from complete head-foot portion yielded an average of 487.5 ng/μl, with good results in qPCR, Re-PCR and qPCR that provided a Ct average of 15.52. *S. mansoni* sporocyst molecular detection from the head-foot portion demonstrated a high variability and specificity. Therefore, it could represent a new tool in early characterization of snail susceptibility to *S. mansoni* in natural conditions and assist in the control of this parasite.

as drug targets. Our group identified MAPKs and in silico analyses and demonstrated by function (SmCdk2, SmHsk, SmERK1, SmERK2 and Smg parasite development, reproduction and survival and may therefore be considered potential targets for the development of new drugs. In this study, we aim to contribute to the experimental characterization of ePKs by the identification of specific genes regulated by MAPKs pathways. To elucidate these target genes, the five selected genes were knocked down by RNA interference in schistosomula and RNA-Seq analysis of treated parasites were performed, including three biological replicates. For all genes selected, we observed approximately 75% reduction on transcript levels, except for SmERK-2. RNA-Seq libraries were then prepared with RNA derived from knockdown parasites according to the Illumina TruSeq mRNA Library Prep protocols and were sequenced on Illumina HiSeq 2500 platform. We generated 27 paired-end libraries that generated 100 bp reads. Sequences were aligned to the latest *S. mansoni* reference genome (version 5.0) and differentially expressed genes were identified by comparing each MAPK knockdown against control parasites treated with untargeted GFP-dsRNA. We also checked the occurrence of potential off-targets by using GFP or mCherry dsRNA as untargeted controls. RNA-seq analyses were performed comparing schistosomulae treated with these untargeted dsRNAs and schistosomulae untreated. This work will allow a better understanding of these signaling pathways, helping to elucidate the functional roles of MAPKs, as well as assisting in the future development of therapeutic intervention tools for schistosomiasis control.

573

HISTONE MODIFYING ENZYMES ARE POTENTIAL THERAPEUTIC TARGETS AGAINST SCHISTOSOMIASIS AS IT IS ESSENTIAL TO VIABILITY AND REPRODUCTION

Pedro H. Aguiar¹, Naizera C. Paula¹, Fernando S. Coelho¹, Polcarpo A. Sales¹, Juliano M. Araújo¹, Luiza F. Andrade¹, Volfgang Suppl², Manfred Jung³, Antonello Mai⁴, Raymond J. Perce⁵, Guilherme C. Oliveira¹, Marina M. Moura¹

¹COPERNICUS, Belo Horizonte, Brazil; ²Martin Luther Universität Halle, Wittenberg, Germany; ³Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg, Germany; ⁴Università degli Studi di Roma La Sapienza, Roma, Italy; ⁵Institut Pasteur de Lille, Lille, France; ⁶Instituto Tecnológico Vale, Belém, Brazil

Schistosomiasis is the second most prevalent parasitic disease in the world. The treatment rely on a single drug, Praziquantel, and due to the identification of drug resistant parasites, the development of new chemotherapy against schistosomiasis is required. Histone modifying enzymes (HMEs) play a central role in regulating chromatin epigenetic modifications and are implicated as therapeutic targets in various diseases. In this work, we employed RNA interference to validate 1 histone deacetylases (SmHDACB), 5 demethylases (SMDM) and 10 methyltransferases

*B

PROGRAMAÇÃO

23 de agosto de 2017

Tema:

Produção Científica e Mecanismos Facilitadores de Pesquisa

08h30 - 09h00 – Abertura

09h00-10h00 – Palestra: "Estado Atual da Obtenção de Recursos para Pesquisa no Brasil" – Prof. Luiz Fernando Onuchic

10h00 – 10h15 - Coffee Break

Infectões Virais (15 minutos)

10h15-10h30: "Incidência e fatores associados ao diabetes mellitus na Coorte Brasil de HIV/AIDS: proposta de um modelo hierárquico" – **Dr Alex Jones Flores Cassenote**

10h30-10h45: "Associação de variante genética no gene MTTP (-493G/T) com esteatose hepática em pacientes infectados com o vírus da hepatite C" – **Dra Mariana Cavalcete Magri**

10h45-11h00: "Identificação e Caracterização do poliovírus associado a Tricodiplasia espinulosa (TSPeV)" – **Camila Malta Romano**

Discussão: 15 minutos

Doenças Tropicais

11h15-11h30: "Diagnóstico da infecção de *Biomphalaria glabrata* por *Schistosoma mansoni* em área de baixa endemicidade, no Estado de São Paulo, pela detecção de esporocistos primários, utilizando técnicas de biologia molecular" – **Marcia Oliveira Casotti**

14h00-15h00: Palestra: "Ética e Pesquisa na Era Digital" – Prof. Alfredo José Mansur

Infectologia Hospitalar

15h00-15h30 – "Ensaio clínico randomizado sobre o tratamento da pneumonia adquirida na comunidade em pacientes com HIV/AIDS: há espaço para os macrolídeos?" – **Dra Claudia Melo**

15h30-15h45: "Rede Candidemia: estudo de vigilância de infecções da corrente sanguínea por *Candida sp* em 9 centros médicos brasileiros" – **Dr. Marcelo Mihailenko Chaves Magri**

Discussão: 15 minutos

15h45-16h00: Coffee Break

16h00 – 16h30: "Estudo clínico-epidemiológico e histológico em pacientes com HIV/AIDS com diagnósticos de neoplasia acompanhados no ICESP" – **Dr Karim Yaqub Ibrahim**

Discussão: 15 minutos

*C

*D

E*

TRABALHOS CIENTÍFICOS

Molecular detection of *Schistosoma mansoni* larval stage in *Biomphalaria glabrata* snail vectors, under experimental conditions

Journal:	<i>Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo</i>
Manuscript ID:	RIMTSP-2019-0076
Manuscript Type:	Original Article
Keyword:	<i>Schistosoma mansoni</i> , <i>Biomphalaria</i> sp, Molecular diagnose, Surveillance

SCHOLARONE™
Manuscripts

55º CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL
XXVI CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA
CHAGASLEISH | 2019

CARTA DE ACEITE

Prezada(o) **Maria Cristina Carvalho do Espírito Santo**

A Comissão Científica do 55º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical e do XXVI Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia, após leitura e análise cuidadosa das propostas submetidas, vem informar que o seu trabalho **Detecção molecular da infecção experimental por *Schistosoma mansoni* em *Biomphalaria glabrata* linhagem BH** foi selecionado para compor programação deste evento, a ser realizado de 28 a 31 de julho de 2019, em Bel Horizonte. Em breve a programação completa estará disponível.

Atenciosamente,

Comissão Científica
55º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical
XXVI Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia