

Seleção genética de *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria tenagophila* visando a alteração da suscetibilidade e resistência ao *Schistosoma mansoni*

Genetic selection of *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria tenagophila* seeking the alteration of the susceptibility and resistance to the *Schistosoma mansoni*

Nádia Regina Borim Zuim¹, Eliana Maria Zanotti-Magalhães¹,
Luiz Augusto Magalhães¹ e Arício Xavier Linhares¹

RESUMO

Gerações de Biomphalaria glabrata e Biomphalaria tenagophila selecionadas geneticamente para resistência e suscetibilidade ao Schistosoma mansoni das linhagens BH e SJ foram utilizadas no estudo da adaptação do trematódeo ao hospedeiro intermediário. As gerações dos planorbídeos foram obtidas por autofecundação dos moluscos que se apresentaram suscetíveis ou resistentes após a exposição aos miracídios de Schistosoma mansoni. Para Biomphalaria glabrata foram obtidas as gerações: Parental, F₁S (Suscetível), F₁R (Resistente), F₂S e F₂R. Para a Biomphalaria tenagophila foram estudadas as gerações: Parental, F₁S, F₁R e F₅₀S. A comparação das taxas de infecção apresentadas pelas diferentes gerações mostrou que, em ambas as espécies, o aumento da suscetibilidade foi mais facilmente obtido do que o aumento da resistência. A dificuldade em aumentar a resistência do molusco ao S. mansoni tem fortes implicações epidemiológicas.

Palavras-chaves: Biomphalaria glabrata. Biomphalaria tenagophila. Schistosoma mansoni. Suscetibilidade.

ABSTRACT

Generations of Biomphalaria glabrata and Biomphalaria tenagophila selected genetically for resistance and susceptibility to Schistosoma mansoni of strains BH and SJ were used in a study of the trematode adaptation to the intermediate host. Descendants of the planorbids were obtained by self-fertilization of the mollusks that became susceptible or resistant after exposure to the miracidia of Schistosoma mansoni. For Biomphalaria glabrata they were obtained from the following generations: Parental, F₁S (Susceptible), F₁R (Resistant), F₂S and F₂R. For Biomphalaria tenagophila the studied generations were: Parental, F₁S, F₁R and F₅₀S. The comparison of the infection rates presented by the different generations showed that the increase in susceptibility was more easily obtained in both species. The difficulty in increasing the resistance of the mollusks to Schistosoma mansoni has important epidemiologic implications.

Key-words: Biomphalaria glabrata. Biomphalaria tenagophila. Schistosoma mansoni. Susceptibility.

Considerando as migrações internas da população brasileira, a expansão da esquistossomose depende da distribuição e da suscetibilidade de seus hospedeiros intermediários.

Os moluscos hospedeiros têm apresentado variado grau de suscetibilidade à infecção por *Schistosoma mansoni*. A *Biomphalaria tenagophila* do Vale do Rio Paraíba do Sul,

SP apresenta elevado grau de resistência à infecção por *S. mansoni* de Belo Horizonte, MG. Porém, é suscetível à linhagem simpátrica. A *Biomphalaria glabrata* de Belo Horizonte, MG é suscetível ao *S. mansoni* local, porém apresenta elevado grau de resistência à infecção por *S. mansoni* de São José dos Campos, do Vale do Rio Paraíba do Sul, SP. Em função

1. Departamento de Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, SP, Brasil.

Apoio financeiro: CNPq, Processo N° 130598/2000-3

Endereço para correspondência: Dra. Nádia Regina Borim Zuim. Dept° de Parasitologia/IB/UNICAMP. Caixa Postal 6109, Cidade Universitária, Barão Geraldo, 13083-970 Campinas, SP, Brasil.

Telefax: 55 19 3289-3124

e-mail: nadiazuim@yahoo.com.br

Recebido para publicação em 13/4/2004

Aceito em 6/6/2005

destes resultados, foram estabelecidas duas linhagens do trematódeo: a linhagem BH (Belo Horizonte) e a SJ (Vale do Rio Paraíba do Sul)⁸. Foi então sugerida uma adaptação fisiológica entre a linhagem do molusco e a linhagem local do parasita⁸. Estudando populações de *B. glabrata* e *B. tenagophila* expostas ao *S. mansoni* de várias localidades, foram verificados diferentes graus de suscetibilidade entre as populações de *Biomphalaria* e o parasita⁹.

Considerando-se a variabilidade genética existente nas amostras do parasita, o nível de suscetibilidade ou resistência dentro de uma população de moluscos é definida pela proporção de caramujos cujos genótipos permitem ou não o desenvolvimento do parasita¹⁵. A suscetibilidade, ou a refratariedade, à infecção por *S. mansoni* apresentada por *B. glabrata* e *B. tenagophila* é controlada geneticamente e constitui caráter hereditário^{6 10 13}. Processos de seleção genética permitiram o isolamento de populações de *B. glabrata* e de *B. tenagophila* altamente suscetíveis, respectivamente à infecção por *S. mansoni* das linhagens BH e SJ¹⁶. A obtenção de populações altamente suscetíveis foi possível através da seleção de gerações utilizando a autofecundação de moluscos suscetíveis à infecção por *S. mansoni*, sendo possível, após a quarta geração, obterem-se taxas de quase 100% de infecção.

A seleção artificial de *B. tenagophila*, por cinco gerações resultou em duas populações de moluscos, uma com níveis de suscetibilidade entre 93 e 100% e outra com níveis entre 0 e 5%⁴.

Foi observado que o trematódeo oriundo de moluscos mais suscetíveis provoca no hospedeiro definitivo patogenicidade mais grave e elevado grau de mortalidade¹⁴. Em roedores infectados com cercárias oriundas de moluscos mais suscetíveis observaram-se maior eliminação de ovos e maior número de granulomas por área de tecido hepático. Aspectos clínicos e patológicos verificados em populações humanas provenientes de diferentes regiões com planorbídeos que apresentam graus distintos de suscetibilidade, confirmam a correlação entre a suscetibilidade do molusco e a elevada patogenicidade do *S. mansoni* no hospedeiro vertebrado¹⁷.

Tendo em vista a importância para a epidemiologia da esquistossomose mansônica, do grau de adaptação entre o *S. mansoni* e seu vetor, estudamos, através de seleção genética, a suscetibilidade e a resistência de *B. glabrata* e de *B. tenagophila* à infecção pelo *S. mansoni* respectivamente das linhagens BH e SJ.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados moluscos *B. glabrata* e *B. tenagophila*, criados no moluscário do Departamento de Parasitologia da Universidade de Campinas, descendentes de caramujos provenientes respectivamente de Belo Horizonte, MG e de São José dos Campos, SP.

Foram utilizadas duas linhagens do trematódeo: a linhagem SJ oriunda de São José dos Campos, SP e mantida em populações de *B. tenagophila* simpátricas e a linhagem BH, originária de Belo Horizonte, BH e mantida em

populações de *B. glabrata* simpátricas. As linhagens de *B. glabrata* e *B. tenagophila* foram selecionadas geneticamente através da autofecundação dos moluscos suscetíveis e resistentes, respectivamente, às linhagens BH e SJ de *S. mansoni*. Os planorbídeos foram expostos individualmente a 10 miracídios e após 30 dias foram examinados por um período de quatro semanas para observação da eliminação de cercárias. Foram examinadas três gerações de *B. glabrata* (parental, F₁R, F₁S, F₂R e F₂S) e três gerações de *B. tenagophila* (parental, F₁S, F₁R e F₅₀S). Tendo em vista que a geração F₁ de *B. tenagophila* se reproduziu pouco e das desovas obtidas não foi possível a constituição de uma geração F₂, devido a morte dos embriões dentro das desovas, optamos por utilizar e analisar a geração F₅₀S, cujo processo de seleção por autofecundação das progêneses descrito anteriormente¹⁶ foi igual àquele por nós realizado. Como naquela ocasião¹⁶, a *B. tenagophila* foi selecionada somente para o caráter suscetibilidade, não foi possível ter uma geração F₅₀ resistente.

As cercárias obtidas de cada espécie de molusco e suas gerações foram utilizadas para infecção de camundongos Swiss, SPF, albinos, provenientes do Biotério Central da UNICAMP, usados como hospedeiros definitivos.

Para análise da taxa de infecção dos moluscos foi utilizado o teste de qui-quadrado, comparando a geração parental de cada espécie de molusco com as gerações selecionadas.

RESULTADOS

Os dados referentes à taxa de infecção de *B. glabrata* e *B. tenagophila* das gerações selecionadas submetidas à infecção por *S. mansoni* das linhagens BH e SJ, encontram-se na Tabela 1. Como pode ser observado, a suscetibilidade à infecção, aumentou acentuadamente, desde a geração F₁ para *B. glabrata* e *B. tenagophila* selecionadas para suscetibilidade ao *S. mansoni* e diminuiu gradualmente para ambas linhagens selecionadas para a resistência ao mesmo trematódeo.

O teste do qui-quadrado foi utilizado para comparar em cada espécie de molusco as taxas de infecção verificadas na geração Parental com as taxas de infecção das gerações selecionadas. Comparando-se a geração parental de *B. glabrata* com a

Tabela 1 - Taxa de infecção de *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria tenagophila* expostas individualmente a 10 miracídios de *Schistosoma mansoni* da linhagem BH e SJ, respectivamente.

Espécie	Geração	Moluscos			Taxa de infecção (%)
		nº	positivos	negativos	
<i>Biomphalaria glabrata</i>	P	100	63	37	63,0
	F ₁ R	37	21	16	57,0
	F ₁ S	45	41	4	91,0
	F ₂ R	41	20	21	49,0
	F ₂ S	26	24	2	92,0
<i>Biomphalaria tenagophila</i>	P	105	6	99	6,0
	F ₁ R	60	2	58	3,0
	F ₁ S	18	10	8	56,0
	F ₅₀ S	51	50	1	98,0

geração F₁ R, as taxas de infecção dos moluscos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si ($\chi^2 = 2,59$), considerando o nível de 5% de significância. Na comparação da geração parental com as gerações F₁S ($\chi^2 = 18,12$), F₂ R ($\chi^2 = 4,81$), e F₂ S ($\chi^2 = 8,30$) observaram-se diferenças estatisticamente significativas nas taxas de infecção.

Não foi verificada diferença estatisticamente significativa entre as taxas de infecção da geração parental de *B. tenagophila* e da geração F₁ R ($\chi^2 = 0,47$). A taxa de infecção da geração parental foi estatisticamente diferente das taxas apresentadas pelas gerações F₁S ($\chi^2 = 33,76$) e F₅₀S ($\chi^2 = 127,13$).

DISCUSSÃO

Entre os fatores envolvidos na infecção de moluscos hospedeiros do *S. mansoni*, estão aqueles de natureza genética. A suscetibilidade de *B. glabrata* à infecção pelo *S. mansoni*, é controlada geneticamente e apresenta caráter hereditário⁶. Este fato foi confirmado¹⁰ quando *B. glabrata*, selecionada a partir de uma geração parental suscetível ao *S. mansoni*, produziu, por autofecundação, descendentes que apresentaram índices de infecção que variaram de 90 a 100%. Moluscos da mesma espécie, porém, originados de pais refratários, produziram descendentes 100% refratários ao *S. mansoni*. A obtenção dessas populações, tanto de suscetíveis, como de refratários, foi conseguida através de três gerações. Nossos dados (Tabela 1) foram plenamente concordantes com aqueles observados anteriormente¹⁰, no que concerne a descendentes suscetíveis, obtidos por autofecundação. A facilidade de obtenção de descendentes suscetíveis das duas espécies de moluscos, é aparentemente devida a alta herdabilidade do caráter suscetibilidade, que é condicionado por pequeno número de genes.

No decorrer do experimento foi isolada, paralelamente à obtenção de gerações de moluscos, uma população de *S. mansoni* resultante de passagens sucessivas nos moluscos selecionados. Esse fato explicaria as altas taxas de suscetibilidade apresentadas pelos moluscos *B. glabrata* e *B. tenagophila*, demonstrando haver um ajustamento fisiológico entre a população do hospedeiro e do parasita. Nossos resultados referentes a *B. glabrata* mostraram que mesmo a geração parental apresentou uma elevada (63%) suscetibilidade, o que demonstra a adaptação do *S. mansoni* a esta espécie. Por outro lado, a *B. tenagophila* apresentou baixa (6%) suscetibilidade na geração parental, confirmando a elevada resistência desses moluscos à infecção pelo *S. mansoni* (Tabela 1). Muitos estudos da genética dos moluscos *B. glabrata* e *B. alexandrina* confirmaram que a relação de especificidade parasita-hospedeiro intermediário é realmente de caráter genético^{5,12}. A resistência à infecção em moluscos adultos é governada por um único gene de acordo com a genética mendeliana¹¹.

A *Biomphalaria tenagophila* na geração F₅₀S apresentou taxa de infecção de 98%. A utilização de *B. tenagophila* F₅₀S se justifica desde que seu processo de seleção¹⁶ foi o mesmo por nós realizado. Além disso, a procedência da geração parental que originou a F₅₀S e a geração F₁S e F₁R de nossos experimentos, é a mesma,

isto é, aleatoriamente foram isoladas de populações de *B. tenagophila* criadas e mantidas em nosso laboratório. Vários são os fatores que afetam a manutenção do ciclo biológico de populações de moluscos mantidos em laboratório. Em moluscos infectados, verifica-se redução quantitativa na produção de ovos principalmente em *B. tenagophila*². A menor produção de ovos foi demonstrada em *B. tenagophila* selecionada geneticamente para a suscetibilidade ao *S. mansoni* quando comparada com *B. tenagophila* não selecionada³. Estudos visando os mecanismos envolvidos na suscetibilidade e na resistência do hospedeiro invertebrado frente ao trematódeo, estudou populações de *B. tenagophila* originada de progênies selecionadas para o caráter resistência ao *S. mansoni* da linhagem SJ⁷. Os resultados não mostraram uma redução da suscetibilidade de *B. tenagophila* ao *S. mansoni* nas três gerações estudadas. Foi aventada a hipótese de que *B. tenagophila* estaria no limite de resistência à infecção pela respectiva linhagem simpátrica do *S. mansoni*.

Apesar de termos avaliado somente duas gerações de *B. tenagophila* (parental e F₁R), não observamos uma diminuição significativa da resistência desta espécie ao *S. mansoni* simpátrico. A resistência absoluta de *B. glabrata* e *B. tenagophila* não foi obtida no processo de seleção genética. Pudemos detectar uma melhor adaptação de *B. glabrata* e *B. tenagophila* selecionadas, quando expostas ao *S. mansoni* também selecionado. Na resistência dos planorbídeos à infecção pelo *S. mansoni* estão envolvidos mecanismos celulares e humorais que resultam em morte do esporocisto. As reações celulares foram muito mais intensas em *B. tenagophila* e *B. glabrata* da geração Parental do que nas gerações selecionadas para a suscetibilidade confirmando dados já publicados¹. A adaptação do *S. mansoni* ao molusco vetor é resultado do balanço entre os mecanismos de defesa do molusco e os mecanismos de escape do parasita. O processo de seleção genética em que a suscetibilidade foi mais facilmente obtida do que a resistência, indica que o parasita apresentou muito mais rapidamente condições de escapar ou então de bloquear os mecanismos de defesa do hospedeiro permitindo seu desenvolvimento nos moluscos.

Este resultado tem grande importância na epidemiologia da esquistossomose mansônica demonstrando a adaptação do trematódeo às populações de planorbídeos e dessa forma justificando a expansão da endemia no território nacional.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Guaraldo AMA, Magalhães LA, Rangel HÁ, Pareja G. Evolução dos esporocistos de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 em *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) e *Biomphalaria tenagophila* (D'Orbigny, 1835). Revista de Saúde Pública 15: 436-448, 1981.
2. Magalhães IA, Carvalho JF. Estudo da postura de duas populações de planorbídeos. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 3: 245-247, 1969.
3. Martuscelli JS, Zanotti-Magalhães EM, Ribeiro OR, Magalhães LA, Linhares AX. Oviposição em *Biomphalaria tenagophila* Selecionada Geneticamente para a Suscetibilidade ao *Schistosoma mansoni*. In: Resumos do Congresso Latinoamericano de Malacologia, São Paulo, p.251, 2002.
4. Mascara D, Kawano T, Magnanelli AC, Silva RPS, Sant'anna AO, Morgantes JS. *Schistosoma mansoni*: Continuous Variation in Susceptibility of the

- Vector Snail of Schistosomiasis, *Biomphalaria tenagophila* I. Self-Fertilization- Lineage. *Experimental Parasitology* 93: 133-141, 1999.
5. Nabih HI, El-Ansary A. Genetic studies on fresh water snails: "specific intermediate hosts for schistosomiasis". II. Isolation and base composition determination of deoxyribonucleic acid. *Cellular and Molecular Biology* 26: 455-458, 1980.
 6. Newton WL. The inheritance of susceptibility to infection with *Schistosoma mansoni* in *Australorbis glabratus*. *Experimental Parasitology* 2: 242-257, 1953.
 7. Oliveira MLPS. Resposta imune em *Biomphalaria tenagophila* selecionada geneticamente para o caráter resistência à infecção por *Schistosoma mansoni*. Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 1998.
 8. Paraense WL, Corrêa LR. Susceptibility of *Australorbis tenagophilus* to infection with *Schistosoma mansoni*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 5: 23-29, 1963.
 9. Paraense WL, Corrêa LR. Differential susceptibility of *Biomphalaria tenagophila* populations to infection with a strain of *Schistosoma mansoni*. *Journal of Parasitology* 64: 822-826, 1978.
 10. Richards CS. Genetic of a molluscan vector of schistosomiasis. *Nature* 226: 806-810, 1970.
 11. Richards CS. *Schistosoma mansoni*: Susceptibility reversal with age in the snail host *Biomphalaria glabrata*. *Experimental Parasitology* 42: 165-168, 1977.
 12. Richards CS, Merritt, JW. Genetic factors in the susceptibility of juvenile *Biomphalaria glabrata* to *Schistosoma mansoni* infection. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 21: 425-434, 1972.
 13. Santana JV, Magalhães LA, Rangel HA. Seleção de linhagem de *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria tenagophila* visando maior susceptibilidade ao *Schistosoma mansoni*. *Revista de Saúde Pública* 12: 67-77, 1978.
 14. Saoud MFA. The infectivity and pathogenicity of geographical strains of *Schistosoma mansoni*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 60: 585-600, 1966.
 15. Theron A, Pages JR, Rognon A. *Schistosoma mansoni*: distribution patters of miracidia among *Biomphalaria glabrata* snail as related to host susceptibility and sporocyst regulatory process. *Experimental Parasitology* 85: 1-9, 1997.
 16. Zanotti-Magalhães EM, Magalhães LA, Carvalho JF. Relação entre a patogenicidade de *Schistosoma mansoni* em camundongos e a susceptibilidade do molusco. I. Infeciosidade das cercárias e carga de vermes. *Revista de Saúde Pública* 25: 359-366, 1991.
 17. Zanotti-Magalhães EM, Magalhães LA, Carvalho JF. Relação entre a patogenicidade do *Schistosoma mansoni* em camundongos e susceptibilidade do molusco vetor. II. Número de ovos nas fezes e número e tamanho dos granulomas nas vísceras. *Revista de Saúde Pública* 29: 265-70, 1993.