

## SELEÇÃO DE LINHAGENS DE *BIOMPHALARIA TENAGOPHILA* E *BIOMPHALARIA GLABRATA* VISANDO MAIOR SUSCETIBILIDADE AO *SCHISTOSOMA MANSONI*

José Valfrido de Santana \*\*  
Luiz Augusto Magalhães \*\*  
Humberto de Araújo Rangel \*\*

RSPUB9/395

SANTANA, J. V. de et al. *Seleção de linhagens de Biomphalaria tenagophila e Biomphalaria glabrata visando maior suscetibilidade ao Schistosoma mansoni*. Rev. Saúde públ., S. Paulo, 12:67-77, 1978.

RESUMO: Utilizando um esquema de seleção individual em progenies autofecundadas, foram obtidas, após quatro gerações, populações de *Biomphalaria tenagophila* e de *Biomphalaria glabrata*, altamente suscetíveis às linhagens do *Schistosoma mansoni* do Vale do Rio Paraíba do Sul, SP e de Belo Horizonte, MG (Brasil), respectivamente. Os rápidos ganhos genéticos obtidos confirmam ser a suscetibilidade de moluscos à infecção esquistossomótica, uma característica de alta herdabilidade, sendo aparentemente condicionada por um pequeno número de genes.

UNITERMOS: *Biomphalaria tenagophila*. *Biomphalaria glabrata*. *Schistosoma mansoni*.

### INTRODUÇÃO

O estudo das linhagens de *Schistosoma mansoni* do Vale do Rio Paraíba do Sul (SP) e de Belo Horizonte (MG), descritas por Paraense e Correa<sup>12</sup> (1963), e mantidas respectivamente em moluscos planorbídeos das espécies *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria glabrata*, vem despertando o interesse de vários pesquisadores.

Os moluscos *B. tenagophila* têm revelado pouca suscetibilidade à infecção pelo *S. mansoni*, tanto em laboratório, como na natureza (Ruiz<sup>24</sup>, 1957; Martins<sup>10</sup>, 1957; Piza e col.<sup>16</sup>, 1959; Piza e col.<sup>17,18</sup>, 1960; Coelho<sup>7</sup>, 1962; Bastos<sup>2</sup>, 1975), ainda que

vários autores tenham referido índices de infecção mais elevados (Ramos e col.<sup>19</sup>, 1961; Paraense e Correa<sup>14</sup>, 1963; Chieffi<sup>4</sup>, 1975).

A baixa suscetibilidade da *B. tenagophila* torna difícil a manutenção do ciclo do *S. mansoni* da linhagem paulista em laboratório, e conseqüentemente, prejudica os trabalhos de patologia, imunologia e outros estudos de biologia, envolvendo essa linhagem.

A suscetibilidade de moluscos à infecção pelo *S. mansoni* é um carácter altamente hereditário (Newton<sup>11</sup>, 1953; Richards<sup>21</sup>,

\* Trabalho realizado com auxílio da FAPESP e do CNPq.

\*\* Do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) — Caixa Postal 1170 — Campinas, SP — Brasil.

1970; Richards<sup>22</sup>, 1973; Richards<sup>20</sup>, 1975; Richards e Merritt<sup>23</sup>, 1972). Com base nessas informações, propusemo-nos, neste trabalho, selecionar indivíduos em prole derivadas por autofecundação, das populações de *B. tenagophila* e de *B. glabrata*, visando aumentar a suscetibilidade às linhagens simpáticas do *S. mansoni*, respectivamente do Vale do Rio Paraíba e de Belo Horizonte.

#### MATERIAL E MÉTODOS

##### 1. Procedência e esquema de seleção de moluscos das espécies *B. tenagophila* e *B. glabrata*.

Os moluscos *B. tenagophila* da geração parental eram descendentes diretos de caramujos capturados no Vale do Rio Paraíba do Sul (SP).

Os exemplares correspondentes da espécie *B. glabrata* eram descendentes diretos de caramujos capturados em Belo Horizonte (MG).

A linhagem de *S. mansoni* do Vale do Paraíba, representaremos pela sigla "SJ" (por ter sido isolada inicialmente em São José dos Campos), e a de Belo Horizonte, pela sigla "BH".

Foi separado, aleatoriamente, um grupo de trinta moluscos por espécie, para formar a geração parental. Estes moluscos foram submetidos à infecção pelas linhagens simpáticas do *S. mansoni*. Dos indivíduos infectados, obtivemos, por autofecundação, a geração F<sub>1</sub>. Procedimento semelhante foi realizado em todas as gerações estudadas, utilizando-se sempre trinta moluscos por geração.

Na Fig. 1 resumimos a metodologia utilizada para a seleção de populações de *B. tenagophila* e *B. glabrata*, suscetíveis à infecção pelo *S. mansoni*.

##### 2. Obtenção de miracídeos das linhagens paulistas (SJ) e mineira (BH) do *S. mansoni*. Infecção de planorbídeos. Obtenção e contagem de cercárias.

Miracídeos das linhagens SJ e BH foram obtidos de fígados de camundongos sacrificados no 60º dia contado a partir da data de exposição às cercárias. Os fígados foram homogenizados em liquidificador, obtendo-se uma suspensão que era submetida a passagem através de peneiras "GRANUTEST", com malhas de 0,037, 0,074 e 0,149 mm.

A suspensão contendo os granulomas retidos na malha de 0,037 mm era transferida para placas de Petri, e colocada du-

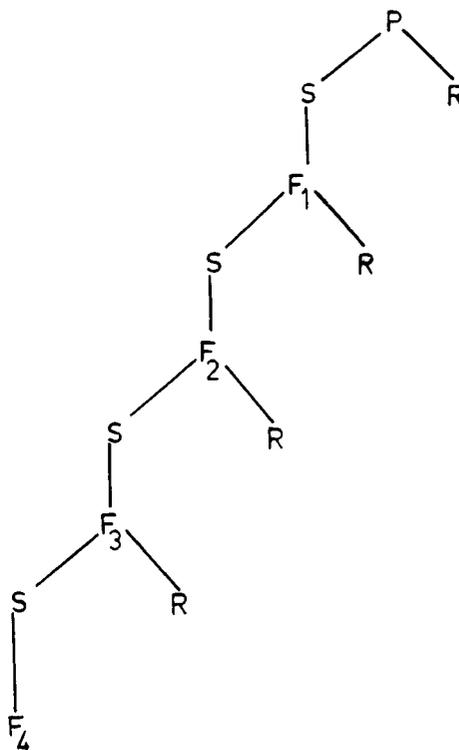


Fig. 1 — Esquema de seleção para a obtenção de populações de moluscos das espécies *B. tenagophila* e *B. glabrata*, suscetíveis ao *S. mansoni*. (30 moluscos por geração para cada espécie). S = suscetíveis; R = resistentes.

rante cerca de 20 min., sob a ação de lâmpadas elétricas, de modo a fornecer temperatura de 28°C e luminosidade suficiente para a eclosão dos miracídios (Standen<sup>27</sup>, 1951). Os miracídios, assim obtidos, foram utilizados para a infecção de moluscos da geração parental.

Moluscos jovens de ambas as espécies, medindo entre 7 e 8 mm de diâmetro, foram expostos individualmente a 10 miracídios, segundo técnica de Standen<sup>28</sup>(1952).

Para a exposição aos miracídios, os moluscos foram divididos em dois lotes, conforme transcrito abaixo.

Lote I — constituído por 30 *B. tenagophila* - expostos a miracídios da linhagem paulista (SJ).

Lote II — constituído por 30 *B. glabrata* - expostos a miracídios da linhagem mineira (BH).

Os miracídios utilizados para a infecção dos caramujos das gerações F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub> e F<sub>4</sub> eram procedentes de fígados de camundongos infectados com cercárias obtidas de moluscos das gerações anteriores.

Após 30 dias da exposição aos miracídios, os moluscos eram examinados semanalmente, sendo expostos a luz artificial, para obtenção de cercárias, segundo técnica descrita por Pellegrino e Macedo<sup>15</sup> (1955). Foi realizada uma estimativa das cercárias eliminadas por cada molusco, adotando-se critério baseado na técnica de Alvim<sup>1</sup> (1974).

Decorridos cem dias, os moluscos que permaneciam negativos eram esmagados entre lâminas de vidro, e examinados ao microscópio estereoscópico, a fim de detectarmos a presença de possíveis esporocistos retardatários.

Empregamos metodologia semelhante a descrita acima, para as gerações F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub> e F<sub>4</sub> de ambas as espécies de planorbídeos.

Para efeito de controle, formamos um lote de 30 moluscos por espécie, não selecionados quanto a suscetibilidade à infecção esquistossomótica. Estes moluscos não foram expostos a miracídios, sendo mantidos isolados durante cem dias. O objetivo desse grupo controle era demonstrar que os índices de mortalidade encontrados eram devidos à infecção dos moluscos pelo *S. mansoni*, e não a fatores técnicos ou ambientes.

## RESULTADOS

Utilizando metodologia resumida na Fig. 1, foram obtidas quatro gerações para cada uma das espécies de moluscos estudadas. A suscetibilidade desses moluscos à infecção pelas linhagens simpátricas do *S. mansoni* aumentou sensivelmente, desde a geração F<sub>1</sub> para *B. glabrata*, e a partir da geração F<sub>2</sub> para *B. tenagophila*. Nas Figs. 2 e 3 podemos verificar o rápido progresso de seleção, no isolamento de populações altamente suscetíveis de *B. tenagophila* e de *B. glabrata*.

De acordo com os dados apresentados nas Tabelas 2 e 3, podemos observar que da taxa de 6,6% de infecção para *B. tenagophila* na geração parental, passamos para 96,6% na geração F<sub>2</sub>. Em *B. glabrata* passamos da taxa de 40,0% de infecção na geração parental para 93,3% na geração F<sub>1</sub>.

As taxas de mortalidade, nas várias gerações estudadas, variaram entre 16,6% a 50,0% para *B. tenagophila*, e entre 33,3% a 73,3% para *B. glabrata* (Figs. 4 e 5).

No lote controle verificamos taxas de mortalidade de 13,3% em *B. glabrata*, durante o período de cem dias; enquanto que em *B. tenagophila* não constatamos mortalidade, no mesmo período. Os dados referentes a estes estudos acham-se agrupados na Tabela 3.

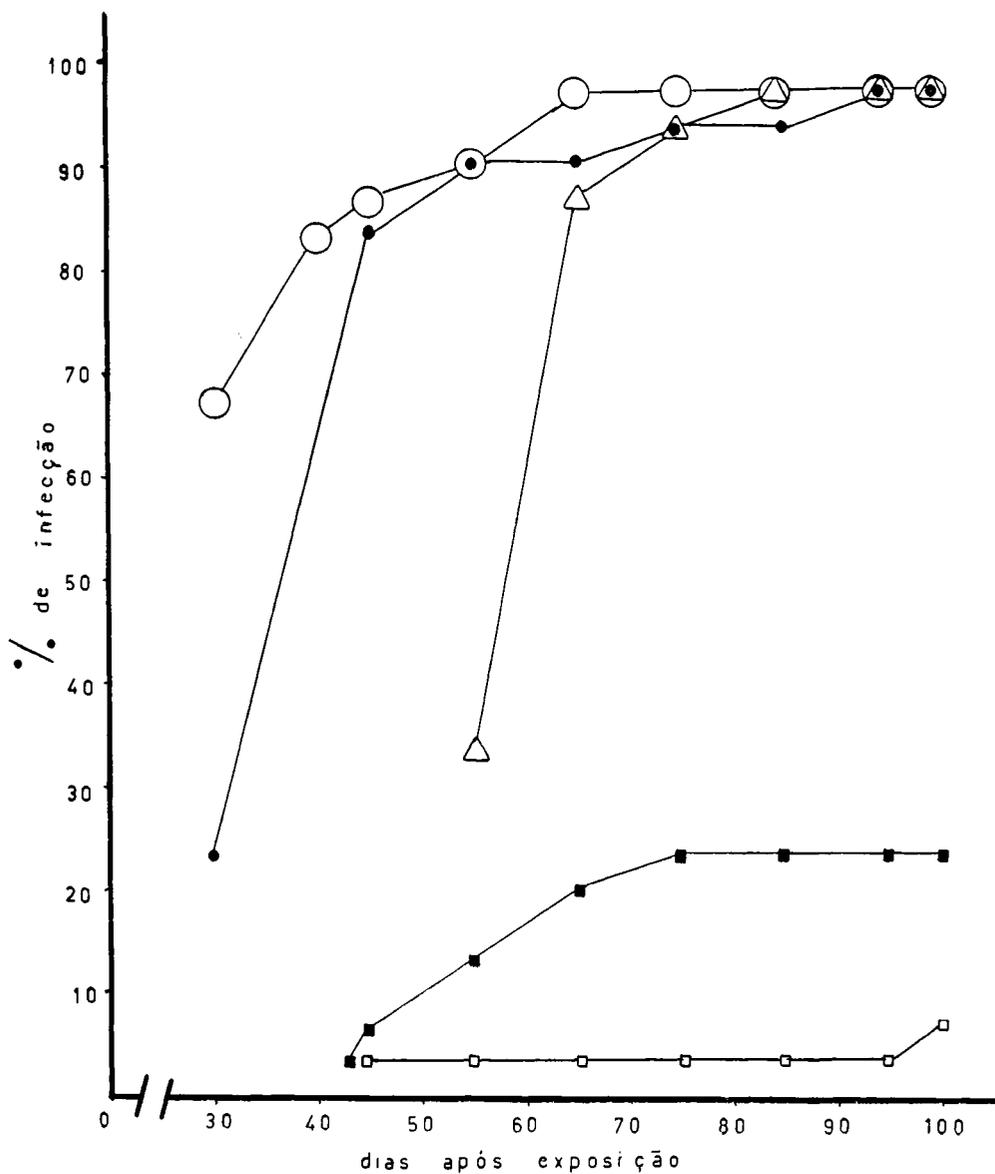


Fig. 2 — Infecção obtida após exposição de exemplares de *B. tenagophila* a miracídeos da linhagem SJ de *S. Mansoni*. Gerações: P □ ; F<sub>1</sub> ■ ; F<sub>2</sub> ○ ; F<sub>3</sub> ● ; F<sub>4</sub> △.

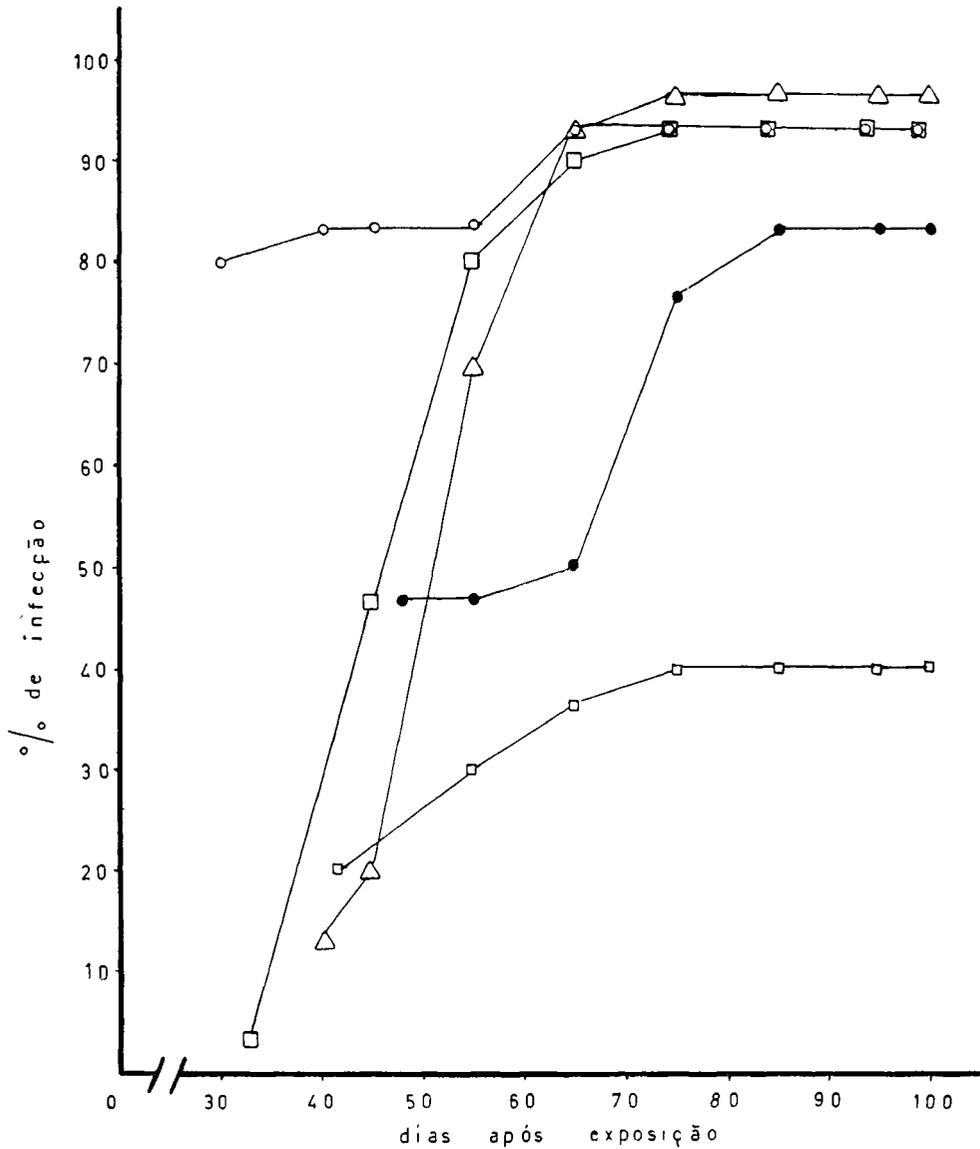


Fig. 3 — Infecção obtida após exposição de exemplares de *B. glabrata* a miracidios da linhagem BH de *S. mansoni*. Gerações: P □ · F<sub>1</sub> □ · F<sub>2</sub> ○ · F<sub>3</sub> ● · F<sub>4</sub> △.

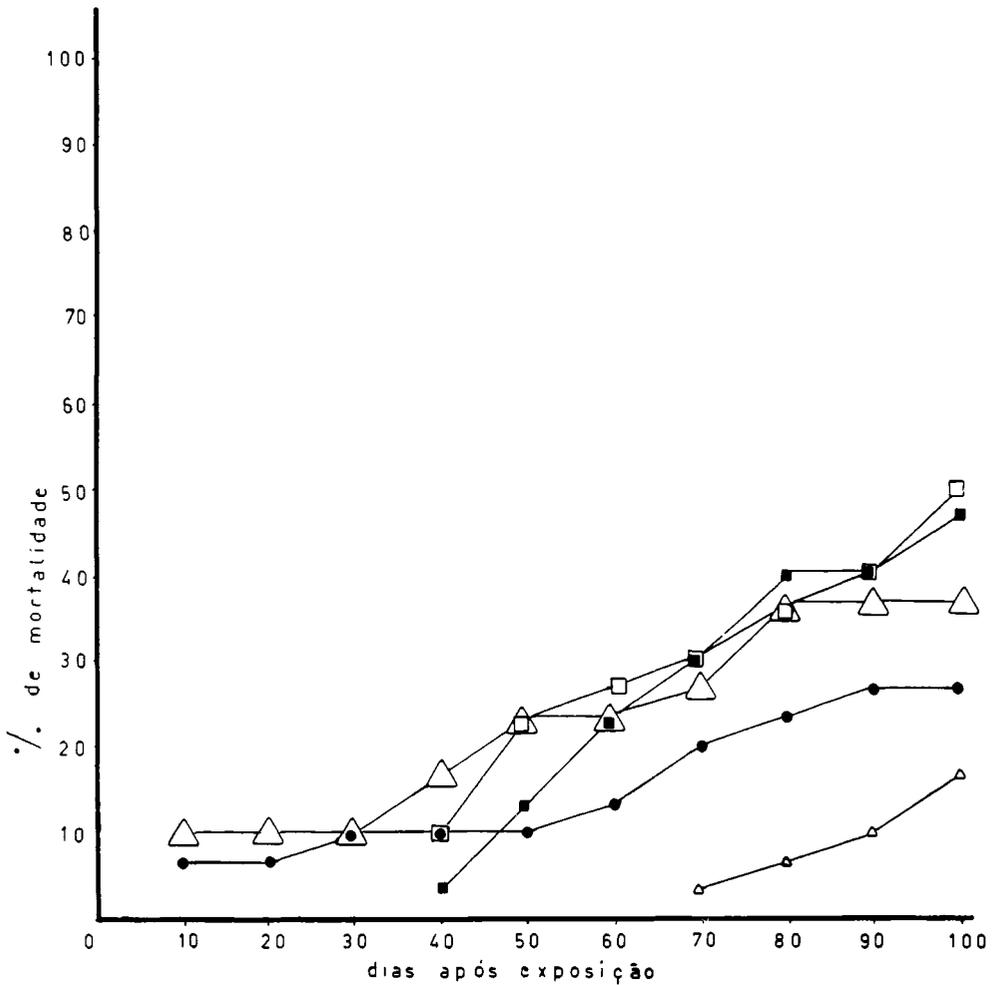


Fig. 4 — Mortalidade obtida após exposição de exemplares de *B. tenagophila* a miracidios da linhagem SJ de *S. mansoni*. Gerações: P △ · F<sub>1</sub> ● · F<sub>2</sub> □ · F<sub>3</sub> ■ ; F<sub>4</sub> △.

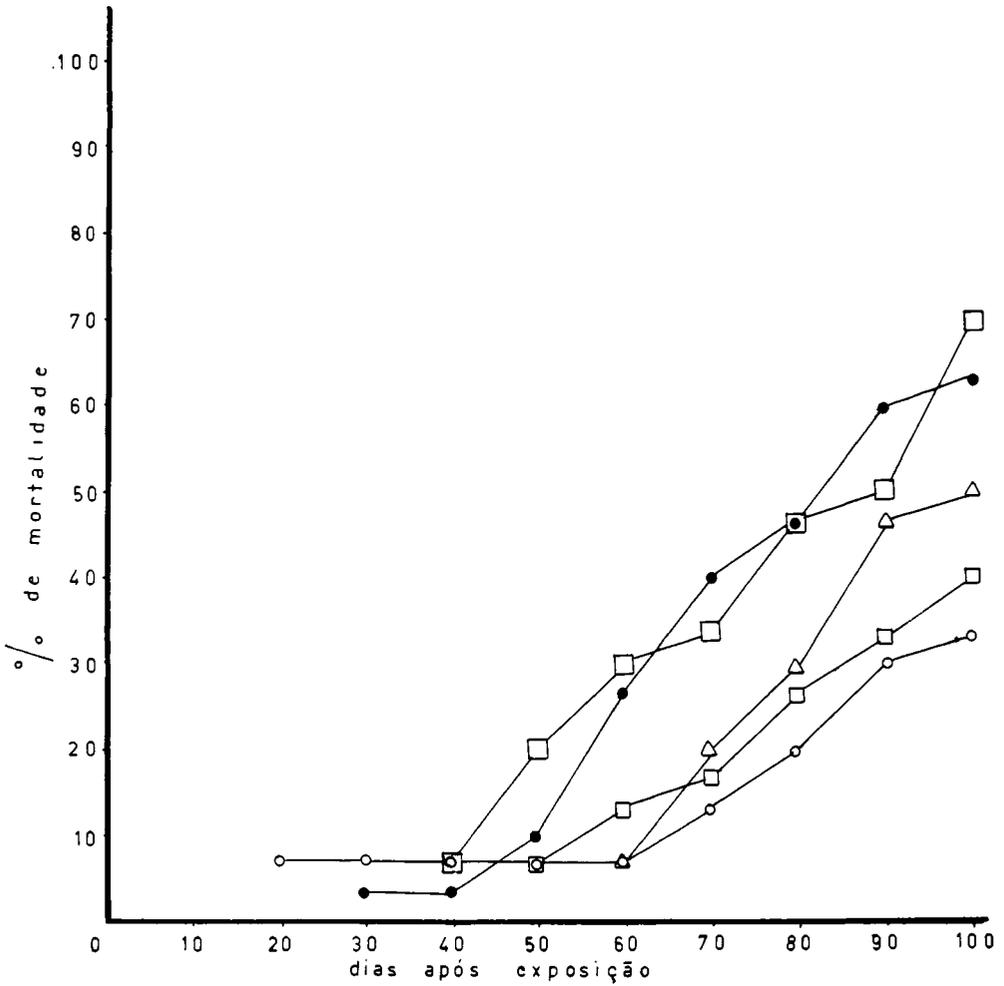


Fig. 5 — Mortalidade obtida após exposição de exemplares de *B. glabrata* a miracidios de linhagem BH de *S. mansoni*. Gerações: P ○ : F<sub>1</sub> ● : F<sub>2</sub> ◻ ◻ : F<sub>3</sub> △.

SANTANA, J. V. de et al. Seleção de linhagens de *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria glabrata* visando maior suscetibilidade ao *Schistosoma mansoni*. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 12:67-77, 1978.

TABELA 1

Resultados obtidos no 100º dia da exposição de *B. tenagophila* a linhagem de *S. mansoni* (Lotes de 30 moluscos por geração, e exposição a 10 miracidios por molusco).

Gerações	Molucos Infectados	Percentagem de moluscos infectados	Mortalidade	Total de cercárias eliminadas	Cercárias moluscos infectados
	nº	%	%	nº	nº
P	2	6,6	36,6	2.412	1.206
F <sub>1</sub>	7	23,3	23,3	18.800	2.686
F <sub>2</sub>	29	96,6	46,6	45.886	1.582
F <sub>3</sub>	29	96,6	50,0	40.993	1.413
F <sub>4</sub>	29	96,6	16,6	53.387	1.841

TABELA 2

Resultados obtidos no 100º dia da exposição de *B. glabrata* a linhagem BH de *S. mansoni* (Lotes de 30 moluscos por geração, e exposição a 10 miracidios por molusco).

Gerações	Moluscos	Percentagem de moluscos infectados	Mortalidade	Total de cercárias eliminadas	Cercárias/molusco infectado
	nº	%	%	nº	nº
P	12	40,0	33,3	30.805	2.567
F <sub>1</sub>	28	93,3	63,3	100.438	3.587
F <sub>2</sub>	28	93,3	40,0	224.234	8.000
F <sub>3</sub>	25	83,3	73,3	79.924	3.197
F <sub>4</sub>	29	96,6	50,0	386.105	13.314

TABELA 3

Mortalidade para moluscos não infectados por *S. mansoni* e não selecionados quanto a suscetibilidade à infecção esquistossomótica (Período de observação — 100 dias).

Espécies	Total de moluscos	Mortalidade
	nº	%
<i>B. tenagophila</i>	30	0,0
<i>B. glabrata</i>	30	13,3

Nas Tabelas 1 e 2 apresentamos, também, o número médio de cercárias eliminadas por molusco, em cada geração.

O exame dos moluscos que até o 100º dia, a contar da data de exposição aos miracidios, não haviam eliminado cercárias não revelou nenhuma forma larvária do verme.

#### DISCUSSÃO

Entre os importantes fatores que determinam a infecção de moluscos pelo *S. mansoni* estão aqueles de natureza genética. Newton<sup>11</sup> (1953) e Richards<sup>21</sup> (1970) demonstraram que a suscetibilidade de *B. glabrata* ao *S. mansoni* era um caráter altamente hereditário. Richards e Merritt<sup>22</sup> (1972) sugeriram que a suscetibilidade dos

moluscos ao *S. mansoni* é provavelmente controlada por quatro pares de fatores genéticos.

A suscetibilidade à infecção pelo *S. mansoni*, entretanto, varia com a idade dos moluscos hospedeiros (Newton<sup>11</sup>, 1953; Wright<sup>2</sup>, 1963; Richards<sup>23</sup>, 1973), sendo os moluscos jovens mais suscetíveis.

Por outro lado, existe uma grande variabilidade de dados encontrados na literatura, com relação a idade e tamanho de moluscos por ocasião da maturidade sexual, fato este, devido, sobretudo, à diversidade das condições de ambiente e alimentação.

Com a finalidade de trabalharmos apenas com moluscos jovens, determinamos, inicialmente, sob nossas condições de laboratório, a época da maturidade sexual em moluscos das espécies *B. tenagophila* e *B. glabrata*. Baseados nestes resultados preliminares, expusemos aos miracidios apenas os moluscos que ainda não haviam atingido a maturidade.

Os dados referentes a *B. glabrata* mostraram que mesmo a geração parental apresentou uma elevada suscetibilidade, demonstrando que estes moluscos já são bem adaptados à infecção esquistossomótica. Estes resultados confirmam aqueles encontrados por Paraense e Correa<sup>13</sup>, 1963; Magalhães<sup>8,9</sup>, 1969, 1970; Chieffi<sup>4</sup>, 1975.

A queda percentual de infecção em *B. glabrata* da geração F<sub>3</sub> em relação as gerações F<sub>2</sub> e F<sub>4</sub>, pode-se justificar pelo fato de ter ocorrido a morte de cinco moluscos, antes de completado o período de observações. Apesar de não nos ter sido possível constatar a infecção esquistossomótica nestes moluscos, verificamos uma perda de capacidade de reprodução destes planorbídeos, sendo esta uma indicação positiva de que provavelmente estavam infectados. A redução da capacidade reprodutora em moluscos infectados, por nós verificada, concorda com os achados de vários autores (Brumpt<sup>3</sup>, 1941; Coelho<sup>5</sup> 1954; Sturrock e Sturrock<sup>27</sup>, 1970).

Em relação a *B. tenagophila*, verificamos que a geração parental apresentou grande

resistência à infecção pelo *S. mansoni*. Dos 30 moluscos expostos aos miracidios, apenas dois mostraram-se infectados no 100º dia. Após a seleção em progenies autofecundadas, conseguimos isolar populações de *B. tenagophila* altamente suscetíveis a infecção simpátrica. Mesmo assim, estas populações apresentaram comportamento diferente com relação as populações estudadas de *B. glabrata*, no que diz respeito ao número de cercárias eliminadas por molusco. Enquanto que para *B. glabrata* obtivemos até 13.000 cercárias por molusco, para *B. tenagophila*, o máximo obtido foi de aproximadamente 2.700 cercárias por molusco. Essa menor produção de cercárias verificada em moluscos da espécie *B. tenagophila* em relação a *B. glabrata*, deve-se provavelmente a mecanismos de imunidade natural. Coelho<sup>6,7</sup> (1957, 1962) verificou grande resistência apresentada pelos tecidos de *B. tenagophila* aos esporocistos do *S. mansoni*, provocando geralmente a lise dessas larvas nos primeiros dias após exposição aos miracidios. Em *B. glabrata*, esse mesmo autor verificou pequena reação tecidual a penetração e evolução do trematódeo.

Nossos resultados confirmam ser a suscetibilidade uma característica altamente hereditária, condicionada aparentemente por um pequeno número de genes. Evidência nesse sentido é dada pelo rápido progresso de seleção, mesmo na presença de alta taxa de "inbreeding".

#### CONCLUSAO

Os dados obtidos indicam que é possível obter modificações substanciais dos graus de suscetibilidade à infecção pelo *S. mansoni*, em populações de moluscos planorbídeos, através de seleção individual de progenies derivadas por autofecundação.

#### AGRADECIMENTOS

Ao Professor William José da Silva, geneticista do Instituto de Biologia da UNICAMP, pela revisão e sugestões apresentadas.

RSPUB9/395

SANTANA, J. V. de et al. [Selection of strains of *Biomphalaria tenagophila* and *Biomphalaria glabrata* to improve susceptibility to *Schistosoma mansoni*.] *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 12:67-77, 1978.

ABSTRACT: Populations of *B. tenagophila* and *B. glabrata* highly susceptible to strains *S. mansoni* from the Valley of the Paraíba do Sul River (State of S. Paulo) and from Belo Horizonte (State of Minas Gerais), were obtained after four generations using a schedule of individual selections in self-fertilized populations. The rapid genetic gains in susceptibility show that molluscan susceptibility to schistosomiasis infection is highly inheritable, and is apparently conditioned by few genes.

UNITERMS: *Biomphalaria tenagophila* — *Biomphalaria glabrata*. *Schistosoma mansoni*.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALVIM, M. C. *Suscetibilidade de B. glabrata e B. straminea do Maranhão a uma cepa simpátrica de Schistosoma mansoni*, Belo Horizonte, 1974. [Tese — Instituto de Ciências Biológicas Univ. Federal de Minas Gerais].
2. BASTOS, O. de C. *Estudo do comportamento parasitológico e imunológico das linhagens humana e silvestre do Schistosoma mansoni Sambon, 1907*, Campinas, 1975. [Tese — Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas]
3. BRUMPT, E. Observations biologiques diverses concernant Planorbis (*Australorbis glabratus* hôte intermédiaire de *Schistosoma mansoni*. *Ann. Parasitol.*, 18(1/3):9-45, 1941
4. CHIEFFI, P. P. *Suscetibilidade à infecção por Schistosoma mansoni, de cepas de Biomphalaria tenagophila originárias dos Estados de São Paulo e Paraná*. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 17: 92-6, 1975.
5. COELHO, M. V. *Ação das formas larvárias de Schistosoma mansoni sobre a reprodução de Australorbis glabratus*. *Publ. Avul. Inst. Aggeu Magalhães*, 3:39-54, 1954.
6. COELHO, M. V. *Aspectos do desenvolvimento das formas larvais de Schistosoma mansoni em Australorbis nigricans*. *Rev. bras. Biol.*, 17:325-37, 1957.
7. COELHO, M. V. *Suscetibilidade de Australorbis tenagophilus à infecção por Schistosoma mansoni*. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 4:289-95, 1962.
8. MAGALHAES, L. A. *Estudo dos dados obtidos de uma população de Biomphalaria glabrata de Belo Horizonte infectada por Schistosoma mansoni da mesma cidade, e de uma população de B. tenagophila de Campinas, infectada por S. mansoni de São José dos Campos*. *Rev. Soc. bras. Med. trop.*, 3: 195-6, 1969.
9. MAGALHAES, L. A. *Estudo do comportamento da cepa de S. mansoni de Brasília*. *Hospital*, Rio de Janeiro. 77: 273-83, 1970.
10. MARTINS, R. S. *Focos ativos de esquistosomose em Niterói*. *Estado do Rio de Janeiro. Rev. bras. Malar.*, 9:361-4, 1957.
11. NEWTON, W. L. *The inheritance of susceptibility to infection with Schistosoma mansoni in Australorbis glabratus*. *Exp. Parasit.*, 2:242-57, 1953.
12. PARAENSE, W. L. & CORRÊA, L. R. *Sobre a ocorrência de duas raças biológicas do Schistosoma mansoni no Brasil*. [Apresentado na XV Reunião da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, Campinas, 1963]
13. PARAENSE, W. L. & CORRÊA, L. R. *Variation in susceptibility of population of Australorbis glabratus to a strain of Schistosoma mansoni*. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 5:15-22, 1963.
14. PARAENSE, W. L. & CORRÊA, L. R. *Susceptibility of Australorbis tenagophilus to infection with Schistosoma mansoni*. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 5:23-9, 1963.

---

SANTANA, J. V. de et al. Seleção de linhagens de *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria glabrata* visando maior suscetibilidade ao *Schistosoma mansoni*. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 12:67-77, 1978.

---

15. PELLEGRINO, J. & MACEDO, D. G. A simplified method for the concentration of cercariae. *J. Parasit.*, 41:329-30, 1955.
16. PIZA, J. T. et al. A esquistossomose no vale do Paraíba. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 19:97-143, 1959.
17. PIZA, J. T. et al. Vale do Paraíba, foco endêmico de esquistossomose. *Arq. Hig.*, S. Paulo, 25:35-40, 1960.
18. PIZA, J. T. & RAMOS, A. S. Os focos autóctones da esquistossomose no Estado de São Paulo. *Arq. Hig.*, S. Paulo., 25:261-71, 1960.
19. RAMOS, A. S. et al. Observações sobre *Australorbis tenagophilus*, transmissor da esquistossomose mansônica. *Arq. Hig.*, S. Paulo, 26:121-4, 1961.
20. RICHARDS, C. S. Genetic factors in susceptibility of *Biomphalaria glabrata* for different strains of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology*, 70:231-41, 1975.
21. RICHARDS, C. S. Genetics of a molluscan vector of Schistosomiasis. *Nature*, 227: 806-10, 1970.
22. RICHARDS, C. S. Susceptibility of adult *Biomphalaria glabrata* to *Schistosoma mansoni* infection. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 22:748-56, 1973.
23. RICHARDS, C. S. & MERRITT, J. W. Genetic factors in the susceptibility of juvenile *Biomphalaria glabrata* to *Schistosoma mansoni* infection. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 21:425-34, 1972.
24. RUIZ, J. M. Esquistossomose experimental. 5. Dados sobre a infestação experimental de "*Biomphalaria tenagophila*" (ORBIGNY) e "*Australorbis glabratus*" (SAY). *Rev. bras. Biol.*, 17:179-85, 1957.
25. STANDEN, O. D. The effect of temperature, light and salinity upon the hatching of the ova of *S. mansoni*. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, 45: 225-41, 1951.
26. STANDEN, O. D. Experimental infection of *Australorbis glabratus* with *Schistosoma mansoni*. I. — Individual and mass infection of snails, and the relationship of infection to temperature and season. *Ann. trop. Med. Parasitol.*, 46:48-52, 1952.
27. STURROCK, B. M. & STURROCK, R. F. Laboratory studies of the host-parasite relationship of *Schistosoma mansoni* and *Biomphalaria glabrata* from St Lucia, West Indies. *Ann. trop. Med. Parasitol.*, 64:357-63, 1970.
28. WRIGHT, C. A. & ROSS, G. C. Electrophoretic studies of blood and egg proteins in *Australorbis glabratus* (Gastropoda, Planorbidae). *Ann. trop. Med. Parasit.*, 57:47-51, 1963.

Recebido para publicação em 23/05/1977

Aprovado para publicação em 14/07/1977