

UNIVERSIDADE TIRADENTES- UNIT
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**ESTUDO DOS ASPECTOS AMBIENTAIS E PROTEICOS DE
Biomphalaria glabrata EM ÁREA RURAL E PRAIANA DA REGIÃO
METROPOLITANA DE ARACAJU, SERGIPE-BRASIL**

TAÍSSA ALICE SOLEDADE CALASANS

Aracaju
Fevereiro – 2019

UNIVERSIDADE TIRADENTES- UNIT
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**ESTUDO DOS ASPECTOS AMBIENTAIS E PROTEICOS DE
Biomphalaria glabrata EM ÁREA RURAL E PRAIANA DA REGIÃO
METROPOLITANA DE ARACAJU, SERGIPE-BRASIL**

Tese de Doutorado submetida à banca
examinadora para a obtenção do título de
Doutor em Saúde e Ambiente, na área de
concentração Saúde e Ambiente.

TAÍSSA ALICE SOLEDADE CALASANS
Orientador (a):
Verónica de Lourdes Sierpe Jeraldo, D.Sc.

Aracaju
Fevereiro – 2019

C145e	Calasans, Taíssa Alice Soledade Estudo dos aspectos ambientais e proteicos de Biomphalaria glabrata em área rural e praiana da região metropolitana de Aracaju, Sergipe-Brasil / Taíssa Alice Soledade Calasans; orientação [de] Prof.^a Dr.^a Verônica de Lourdes Sierpe Jeraldo – Aracaju: UNIT, 2019. 90 f. il ; 30 cm Tese (Doutorado em Saúde e Ambiente) - Universidade Tiradentes, 2019 Inclui bibliografia. 1. Biomphalaria glabrata. 2. Fatores ambientais. 3. Proteômica. I. Calasans, Taíssa Alice Soledade. II. Jeraldo, Verônica de Lourdes Sierpe (orient.). III. Universidade Tiradentes. IV. Título. CDU: 616. 995. 122-076
-------	--

SIB- Sistema Integrado de Bibliotecas

ESTUDO DOS ASPECTOS AMBIENTAIS E PROTEICOS DE *Biomphalaria glabrata* EM ÁREA RURAL E PRAIANA DA REGIÃO METROPOLITANA DE ARACAJU, SERGIPE-BRASIL

Taíssa Alice Soledade Calasans

TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA À BANCA EXAMINADORA PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM SAÚDE E AMBIENTE, NA ÁREA DE CONCENTRAÇÃO SAÚDE E AMBIENTE.

Aprovada por:

Verónica de Lourdes Sierpe Jeraldo, D.Sc.
Orientadora

Idessania Nazareth da Costa, D.Sc.
Universidade Estadual de Londrina

Sona Arun Jain, D.Sc.
Universidade Tiradentes

Claudia Moura de Melo, D.Sc.
Universidade Tiradentes

Rubens Riscala Madi, D.Sc.
Universidade Tiradentes

Aracaju
Fevereiro – 2019

DEDICATÓRIA

Ao meu pai, José Calasans Menezes (in memoriam).
À minha mãe, Vera Lúcia Soledade Menezes.

EPÍGRAFE

Gratidão gera gratidão... A frase: "Alegrem-se que virão coisas alegres", expressa uma grande verdade."

Por Meishu-Sama.

AGRADECIMENTOS

Foram quatro anos de dedicação e aprimoramento diário para elaboração deste trabalho, e não seriam possíveis sem a colaboração, estímulo e empenho de algumas pessoas. Diante deste fato, gostaria de expressar toda a minha gratidão e carinho a todos aqueles que contribuíram para que este trabalho se tornasse uma realidade. Assim, inicio agradecendo a Deus por me apresentar oportunidades, nas quais, pude viver experiências de fé e determinação para cumprir mais essa missão. O teu amor cobriu as minhas fraquezas e a tua fidelidade foi maior do que todos os obstáculos na minha vida. Obrigada!

Aos meus pais, pela sólida formação na graduação que proporcionou a continuidade nos estudos até o doutorado. As minhas irmãs Ingrid Calasans e Tâmara Calasans, pela parceria carinhosa durante esses anos. Que família! Aquela que com amor e cumplicidade, compreendeu com paciência todos os meus momentos de presença e ausência familiar.

Sempre ressaltei para os que me perguntavam que, a minha orientadora, Doutora Verónica de Lourdes Sierpe Jeraldo, foi, e é o meu maior expoente. Ela não só me permitiu liberdade de ação neste trabalho, mas contribuiu para que alavancasse o meu desenvolvimento pessoal e profissional. Professora, a sua transmissão de confiança, foi de grande força na minha continuação. Eu aprendi muito, eu vivi um doutorado de papel, de campo, de laboratório e de vida. Gracias!

A Dr^a Claudia Melo que a considero como minha orientadora do “pensar”, pois literalmente me ensinou a pensar como parasitologista raiz. Muito obrigada, por solidificar as experiências de ensino e oportunidades que vivenciei!

Todos têm motivos para a gratidão, quando pessoas nas nossas vidas têm tempo para compartilhar e nos fazer saber por atos que podemos contar com elas. Assim, agradeço aos amigos Aline Hora, André Mota, Camila Santos, Fernanda Cunha, Guilherme Mota, Jamille Desirée, João Marcos, Juliana Meneses, Rafaela Oliveira, Rebeca Oliveira e Sarah Gabriela.

A toda equipe dos Laboratórios de parasitologia e biologia tropical do Instituto de tecnologia e Pesquisa: alunos e professores. A Dr.^a Silmara Allegretti e Dr.^a Fernanda Cabral, pela disponibilidade de tempo em ensinar técnicas realizadas no Departamento de Biologia Animal da Universidade Estadual de Campinas. A Dr.^a Silvana Belo, pelo aceite e recepção no intercâmbio realizado na Universidade Nova de Lisboa. Ao Mestre Luis Bogaio, obrigada pela companhia e toda ajuda no laboratório do IHMT em Portugal.

Agradeço a Fundação de Apoio à Pesquisa e à Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe (FAPITEC/SE) pela bolsa de estudos. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela outorga de bolsa pelo programa institucional de bolsas de doutorado sanduíche no exterior. Assim, foi possível obter e aprimorar conhecimentos para cumprir este trabalho.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	13
2.1 Geral	13
2.2 Específicos	13
3 CAPITULO I - REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1 Características da espécie <i>Biomphalaria glabrata</i>	14
3.2 <i>Biomphalaria glabrata</i> : Aspectos ecológicos e comportamentais	20
3.3 Ocorrência do hospedeiro <i>B. glabrata</i> em regiões litorâneas	22
3.4 Esquistossomose: <i>Schistosoma mansoni</i> , biologia, transmissão e tratamento	25
3.5 <i>Schistosoma mansoni</i> – taxonomia e morfologia	28
3.6 Ciclo de vida e relação parasita/hospedeiro	30
3.7 Epidemiologia da esquistossomose	33
3.8 Esquistossomose e fatores socioeconômicos e ambientais	35
4 CAPITULO II - MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 Áreas de estudo	38
4.2 Dados pluviométricos.....	39
4.3 Análises físico-químicas e microbiológica da água	40
4.4 Análise do sedimento	40
4.5 Coletas de moluscos	41
4.6 Análises parasitológicas	41
4.7 Gradiente de salinidade.....	41
4.8 Extração de proteínas.....	42
4.9 Análises estatísticas e bioinformática.....	43
5 REFERÊNCIAS	44
6 CAPITULO III – ARTIGO 1.....	54
7 CAPITULO IV– ARTIGO 2 – COMUNICAÇÃO BREVE	76
8 CONCLUSÃO GERAL	90

RESUMO

A esquistossomose mansônica é uma infecção parasitária, cujo agente etiológico é o helminto *Schistosoma mansoni*, que envolve a espécie *Biomphalaria glabrata* como seu principal hospedeiro intermediário. Conhecida como uma parasitose desenvolvida, sobretudo em áreas rurais, a infecção tem sido notificada em grandes centros urbanos e regiões litorâneas, que são confirmados com casos humanos ou a presença de hospedeiros transmissores nessas localidades. Diante desse contexto, o presente trabalho teve como objetivo estudar aspectos ambientais e de proteoma de moluscos coletados na praia de Aruanda e em área rural da região metropolitana de Aracaju, Sergipe. Durante o estudo, foram realizadas coletas de *B. glabrata*, submetidas a análises parasitológicas e proteômicas. Em paralelo foram realizadas análises físico-químicas e microbiológicas das coleções hídricas e do sedimento dos criadouros, além de realizado o experimento para testar o efeito do gradiente de salinidade sobre a sobrevivência dos moluscos. No período de junho de 2015 a julho de 2017, foram coletados um total de 6.423 moluscos, sendo 2.032 no ponto praia e 4.391 no ponto rural. Os resultados de infecção parasitológica revelaram moluscos de ambos os pontos (praia e rural) liberando cercárias de *S. mansoni*. As variáveis ambientais e físico-química da água e sedimento quando comparadas entres os pontos de coleta no período de seca, apresentaram valores maiores na praia como, por exemplo, a Precipitação (30,3 mm), Temperatura (28,9 °C), Turbidez (15,6 NTU) /, pH (7,2) e Manganês (24,2). As análises microbiológicas da água revelaram a positividade de coliformes totais e *Escherichia coli*, tanto no período seco e chuvoso. O teste de salinidade revelou que os moluscos coletados na praia, permaneceram vivos, quando expostos às diluições de 25 e 30% e 40 a 95% e os moluscos da rural se encontravam vivos em todas as diluições, exceto de 5%. Sendo assim, os resultados deste estudo comprovam que as localidades avaliadas possuem características ambientais favoráveis para o desenvolvimento dos moluscos que se mostraram resistentes a diversos parâmetros físico-químicos. Resultados estes compatíveis com os achados na análise de proteínas onde foram identificadas proteínas de alta afinidade por contaminantes ambientais. Concluindo que a junção desses resultados gera um possível entendimento da sobrevivência de *B. glabrata* em criadouros de diferentes ambientes. Fator importante na busca de desenvolver novas medidas para o controle da transmissão da esquistossomose.

Palavras-chave – *Biomphalaria glabrata*; fatores ambientais, proteômica.

ABSTRACT

Schistosomiasis *mansoni* is a parasitic infection whose etiological agent is the helminth *Schistosoma mansoni*, which involves the species *Biomphalaria glabrata* as its main intermediate host. Known as a developed parasite, especially in rural areas, infection has been reported in large urban centers and coastal regions, which are confirmed with human cases or the presence of transmitting hosts in these localities. The objective of this study was to study the environmental and proteomic aspects of mollusk collected in the Aruanda beach and in the rural area of the Aracaju metropolitan region, Sergipe. During the study, *B. glabrata* collections were submitted to parasitological and proteomic analyzes. In parallel, physical-chemical and microbiological analyzes of the water and sediment collections of the breeding sites were carried out, besides the experiment to test the effect of the salinity gradient on the survival of the mollusk. In the period from June 2015 to July 2017, a total of 6,423 mollusk were collected, being 2,032 at the beach point and 4,391 at the rural point. The results of parasitological infection revealed mollusk from both points (beach and rural) releasing *S. mansoni* cercariae. The environmental and physico-chemical variables of water and sediment, when compared between collection points in the dry season, presented higher values on the beach, such as Precipitation (30.3 mm), Temperature (28.9 ° C) , Turbidity (15.6 NTU), pH (7.2) and Manganese (24.2). Microbiological analyzes of water revealed the positivity of total coliforms and *Escherichia coli*, both in the dry and rainy season. The salinity test revealed that the mollusk collected on the beach remained alive when exposed to 25 and 30% and 40 to 95% dilutions and the rural mollusk were alive at all dilutions, except for 5%. Thus, the results of this study prove that the evaluated locations have favorable environmental characteristics for the development of mollusk that have been resistant to several physicochemical parameters. These results are compatible with the findings in protein analysis where high affinity proteins were identified by environmental contaminants. Concluding that the combination of these results generates a possible understanding of the survival of *B. glabrata* in breeding sites of different environments. An important factor in the search to develop new measures to control the transmission of schistosomiasis.

Keywords– *Biomphalaria glabrata*; environmental factors; proteomics.

1 INTRODUÇÃO

As diversidades naturais do meio ambiente servem de atrativos para a movimentação de pessoas, que buscam por práticas de lazer e turismo de interação com a natureza. No entanto, estas práticas podem ocasionar riscos, individuais e coletivos, para a saúde da população (MATOS; BARCELLOS, 2010).

Na maioria das vezes as práticas são realizadas em ambientes caracterizados por coleções hídricas, onde a população, seja ela, local ou turística, utiliza para fins diversos em seu entretenimento. No entanto, podem existir perigos de contaminação das coleções hídricas quando ligadas a redes de esgotos e presença de moluscos de importância epidemiológica do gênero *Biomphalaria* sp. (CONCEIÇÃO et al., 2016).

Os moluscos são hospedeiros intermediários no ciclo biológico do helminto *Schistosoma* sp., causador da esquistossomose em seres humanos (ROCHA et al., 2013). A infecção humana acontece devido à presença destes moluscos infectados que liberam cercarias do helminto nos ambientes hídricos (GRIMES et al., 2015). Estes ambientes podem ser naturais (rios, lagos, lagoas) e/ou artificiais (canais de irrigação, valas, córregos, poças pluviais), locais muito utilizados pelo homem nas suas atividades, o que facilita a transmissão da esquistossomose (TIBIRIÇA et al., 2011).

Os moluscos são encontrados nos ambientes aquáticos decorrente de serem transportados por pássaros e intervenções antrópicas como a agricultura e piscicultura contribuindo com o surgimento de criadouros (SOUZA et al., 2008). Estes possuem características que facilitam a sua sobrevivência em vários ambientes, seja pela capacidade de adaptação a parâmetros físicos e químicos da água ou facilidade em se enterrar no substrato onde habitam suportando, por exemplo, valores de salinidade superior ao que estão habituados (SILVA et al., 2006). A adaptação e dispersão do molusco para novos ambientes onde ocorre constante transição de pessoas pode gerar a expansão geográfica da esquistossomose devido ao movimento migratório de comunidades locais e turísticas (GOMES et al., 2012).

Inicialmente considerada uma endemia rural e de comunidades que estão à margem do desenvolvimento econômico, a esquistossomose expande-se para áreas urbanas e litorâneas que apresentam um padrão de vida maior (SILVEIRA; SARTORI, 2011; BARBOSA et al., 2013).

Os estados que compõem a região nordeste do Brasil têm sofrido uma grande transformação urbanística, tanto pelo turismo quanto pela expansão imobiliária. A urbanização das zonas próximas às praias tem gerado problemas estruturais e

ambientais, tais como instalações inadequadas de tubulações e vegetação, que provocam o acúmulo de águas doces e salgadas na faixa de areia. Estes locais podem servir de criadouros para os moluscos, demonstrando potencialidade como área de risco de transmissão da esquistossomose. Isto é possível, visto que estes animais vêm demonstrando capacidade adaptativa em condições adversas do ambiente (SILVA et al., 2006).

O Sistema Nacional de Vigilância em Saúde relata que no Estado de Sergipe, a esquistossomose é endêmica em 51 dos 75 municípios, principalmente da Zona da Mata e do Litoral, estabelecendo ampla área de distribuição da doença em áreas rurais e urbanas, com coleções hídricas que favorecem o surgimento de criadouros de *Biomphalaria* (BRASIL, 2008; ROLLEMBERG et al., 2011).

A presença da espécie *Biomphalaria glabrata* na faixa de areia já foi registrada na praia da Aruanda, município de Aracaju (CALASANS et al., 2013). Este local tem alto apelo turístico, sendo procurado também por comunidades locais. Além disso, o local fica no início da zona de expansão do município, sendo, portanto, de alta especulação imobiliária, atraindo uma magnitude populacional a residirem na localidade. Dentro desta perspectiva, é imprescindível o entendimento das características do molusco e do ambiente em que esses são encontrados.

Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo estudar aspectos ambientais e de proteoma de moluscos coletados na praia de Aruanda e em área rural da região metropolitana de Aracaju, Sergipe.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar as características ambientais e proteômica de moluscos *Biomphalaria glabrata* em criadouros de transmissão da esquistossomose em área rural e praiana na região metropolitana de Aracaju, Sergipe.

2.2 Específicos

. Verificar a presença de moluscos infectados por *Schistosoma mansoni* nos locais amostrados;

Analisar os parâmetros físico-químicos da água e sedimento dos ambientes colonizados por moluscos transmissores do *S. mansoni*;

Utilizar ferramentas microbiológicas para avaliar a água dos criadouros quanto à poluição por coliformes totais e *Escherichia coli*;

Avaliar o efeito da salinidade na sobrevivência dos moluscos;

Identificar as proteínas expressadas nos moluscos coletados nas duas áreas amostradas.

3 CAPITULO I - REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Características da espécie *Biomphalaria glabrata*

Os moluscos do gênero *Biomphalaria* transmissores do *Schistosoma mansoni* pertencem à família Planorbidae, cujas espécies são: *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea* (SOUZA; LIMA, 1990). Essas espécies são compostas por: dois tentáculos longos e filiformes, olhos na base dos tentáculos, a boca que é contornada pela mandíbula, e em formato de T quando vista de frente, possui concha do tipo discoide, com diâmetro de 7 a 40 mm, em sua cor natural amarelo-palha, mas pode se modificar quando entra em contato com substâncias corantes dissolvidas na água dos criadouros, exemplo, o óxido de ferro, que confere conchas de coloração mais escuras, com tons de marrom que pode chegar a preto (BRASIL, 2008; CARVALHO; COELHO; LENZI, 2008). Sua concha possui ainda uma zona central profunda, chamado umbigo, em ambos os lados, que originou o termo que denomina o gênero (*Biomphalaria*: do latim bis = duas vezes, do grego *omphalos* = umbigo) (PARAENSE, 2008). O seu colo apresenta suas aberturas genitais. Na porção cefálica, seu manto se dobra para formar a cavidade pulmonar.

A porção do manto é indispensável para a sua identificação, o qual pode ser observados: (1) o coração, contido no pericárdio e constituído por uma aurícula e um ventrículo; (2) parte da glândula de albúmen; (3) as veias pulmonar e renal; (4) o ureter e seu meato; (5) o rim; (6) o pneumóstoma; e (7) a crista lateral (BRASIL, 2008). Exibe a hemolinfa vermelha, o rim composto por uma porção sacular, justaposta à esquerda do pericárdio, com continuidade por uma porção tubular (túbulo renal em formato de J) situada entre a veia renal e veia pulmonar. É considerado o principal caráter diagnóstico da espécie *B. glabrata*, que possui sua crista renal situada no manto (Figura 1).

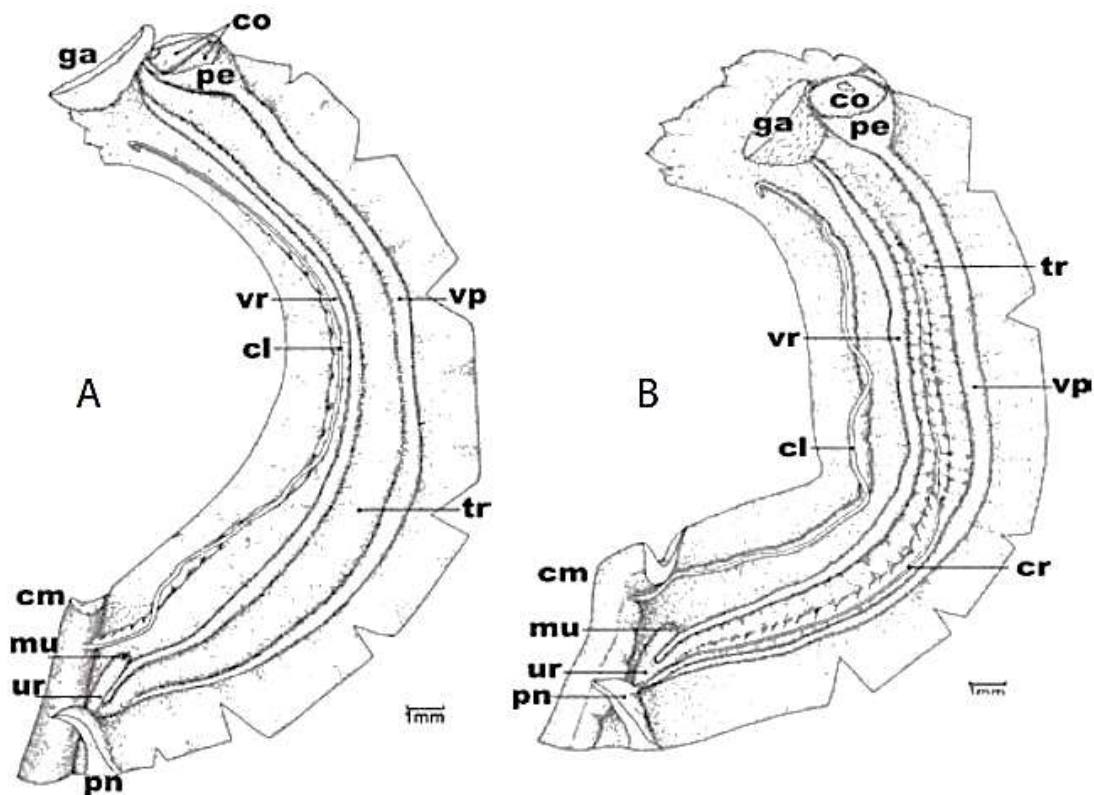


Figura 1 – A) Manto da *Biomphalaria* sp.; B) Manto da *B. glabrata*, com crista renal. Estruturas: coração (co), pericárdio (pe), glândula de albúmen (ga), veia pulmonar (vp), veia renal (vr), tubo renal (tr), crista lateral (cl), crista renal (cr), colar do manto (cm), ureter (ur), meato do ureter (mu) e pneumóstoma (pn). Extraído de Paraense (1975).

Fonte: BRASIL, 2008.

No sistema respiratório predomina-se a respiração atmosférica: a hematose ocorre na rede vascular da parede pulmonar, onde o sangue flui para o coração através da veia pulmonar. Sua respiração aquática ocorre através da pseudobrânquia e do tegumento em contato com o meio líquido. O sistema nervoso é composto por 11 gânglios: conjunto de cinco pares (buciais, cerebrais, pleurais, pedais e parietais), e um isolado (visceral). Os moluscos se alimentam de algas, bactérias, fragmentos de animais, vegetais e sais minerais, dependendo do substrato em que os planorbídeos se encontrem. Sua alimentação ocorre através da rádula presente no saco bucal, que raspa o substrato e extrai os alimentos (BARBOSA, 1995; CARVALHO; COELHO; LENZI, 2008; TEIXEIRA et al., 2011).

Como todos os pulmonados, os planorbídeos são hermafroditas e pode autofecundar-se, mas preferencialmente realizam fecundação cruzada o que possibilita uma troca maior de material genético (BRASIL, 2008). Seu sistema genital envolve um órgão produtor de células germinais masculinas e femininas – o ovotéstis, que ocupa a extremidade caudal do corpo e, assim, os giros centrais da concha, ao qual se segue uma via para eliminação daquelas células (ovispermiduto ou canal

hermafrodita), que subdivide-se em um ramo masculino e outro feminino. O sistema genital fornece as características morfológicas mais importantes para a identificação dos planorbídeos, representadas na Figura 2 (CARVALHO; COELHO; LENZI, 2008).

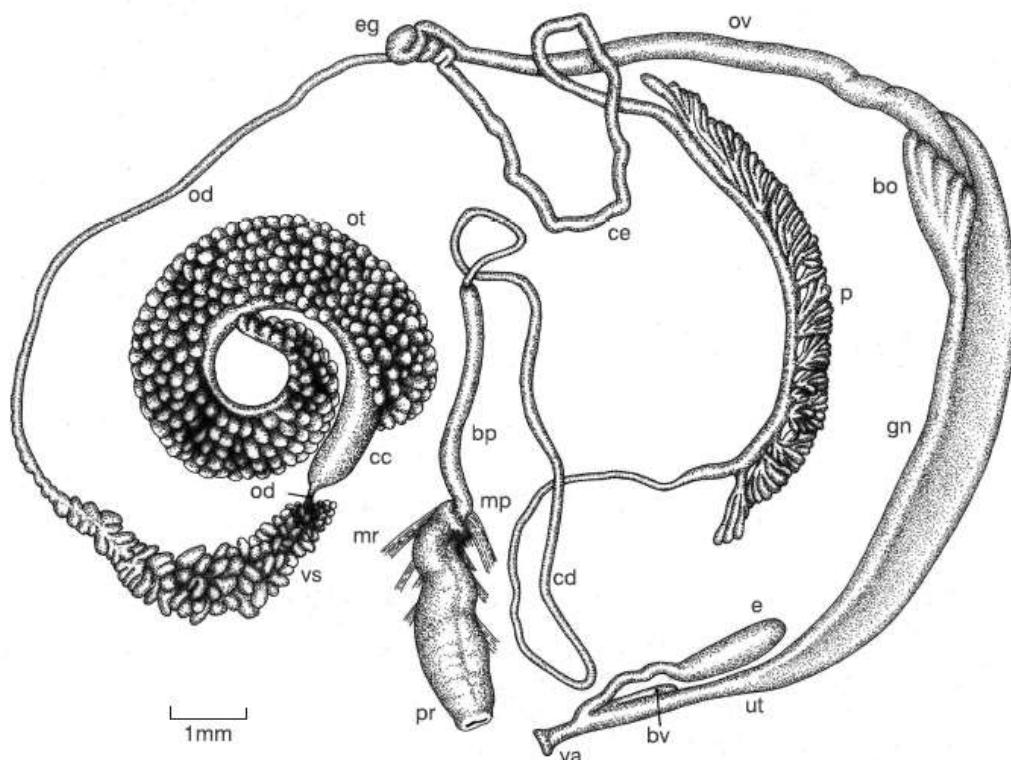


Figura 2 – Sistema reprodutor dissecado da *B. glabrata*: bolsa do oviduto (bo), bainha do pênis(bp), bolsa vaginal(bv), canal coletor do ovo teste (cc), canal deferente(cd), canal espermático(ce), espermateca(e), encruzilhada genital ou Carrefour(eg), glândula nidamental(gn), músculo protrator do prepúcio (mp), músculo retrator do prepúcio(mr), ovispermiduto (od), ovoteste(ot), oviduto(ov), próstata(p), prepúcio(pr), útero(ut), vagina (va), vesícula seminal(vs).

Fonte: CARVALHO; COELHO; LENZI, 2008.

B. glabrata é a espécie mais favorável à infecção pelo *S. mansoni* devido a sua ampla distribuição geográfica (SCHOLTE et al. 2012). Este molusco é o maior da família *planorbidea*, apresenta concha adulta (Figura 3) com 20 mm a 30 mm de diâmetro no máximo na grande maioria das espécies, que pode atingir a cerca de 40 mm de diâmetro em ambientes mais propícios, largura entre cerca de 5 mm a 8 mm, com cerca de seis giros arredondados, crescendo lentamente em diâmetro, bem visíveis em ambos os lados, e o central mais exposto à esquerda. O lado direito, largamente côncavo, com o giro central profundo, e o esquerdo formandorasa concavidade. Sutura demarcada em ambos os lados, com periferia arredondada, e tendência para a direita. Abertura oval ou arredondada. Em alguns casos, a concha é habitualmente mais larga, chegando a apresentar considerável grau de carenação bilateral mais acentuada à esquerda (PARAENSE, 1961; BARBOSA, 1995).

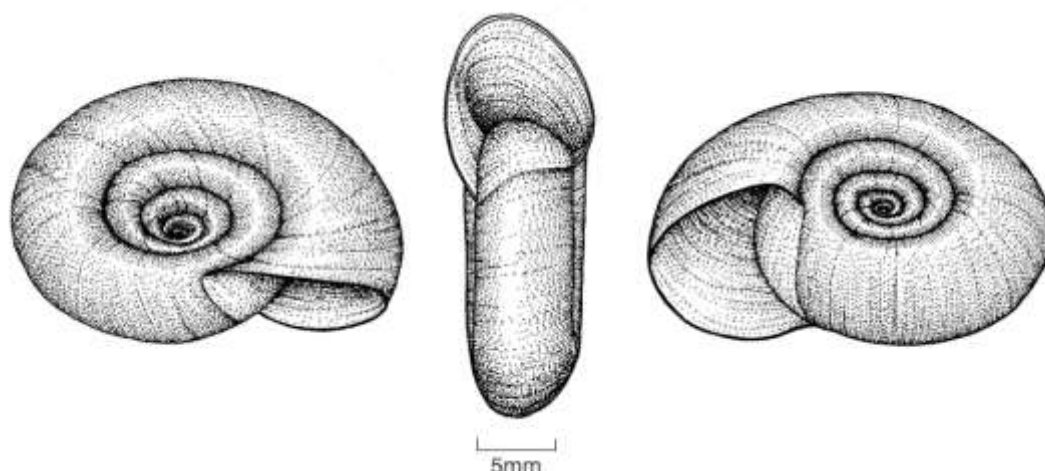


Figura 3 – Concha da *Biomphalaria glabrata*.
Fonte: CARVALHO; COELHO; LENZI, 2008.

Os moluscos da espécie *B. glabrata* são encontrados na água doce e de pequena correnteza, preferem locais onde há plantas ou lama com substâncias orgânicas, entretanto, quando existe quantidade suficiente de nutrientes, se adaptam aos reservatórios de pedra ou cimento (PARAENSE, 1986; BRASIL, 2009).

Influenciados diretamente pelo ambiente em que habita, os moluscos do gênero *Biomphalaria* sp, tem desenvolvido uma variedade em estratégias de sobrevivência. São capazes de resistir a rigorosas condições climáticas e podem sobreviver fora da água por períodos relativamente longos. Na falta de água, a primeira resposta dos moluscos é a retração do corpo no interior da concha. Tal resposta corresponde a diminuição dos efeitos diretos da dessecação; que por outro lado, o obriga a sobreviver de suas próprias reservas alimentares, com um suprimento limitado de oxigênio e a acumulação de excretas potencialmente tóxicas. Contudo, a sua sobrevivência fora da água vai depender de sua capacidade de conservar recursos (tais como a água, o oxigênio e a energia) e eliminar ou neutralizar os produtos tóxicos do metabolismo (BRASIL, 2008; CARVALHO et al., 2018).

As três espécies de moluscos hospedeiros no Brasil possuem capacidade de resistir à dessecação: em maior grau a *B. straminea*, ou menor grau a *B. tenagophila*, e a *B. glabrata*, que apresenta modificações morfológicas, na sua fase juvenil, que também colaboram para sua sobrevivência durante o período de seca, através do espessamento e da diminuição da área de abertura da concha, e a formação de lamelas e epifragmas próximo à abertura. No entanto de maneira geral, essas modificações são associadas ao seu comportamento (tendência persistente a sair da água) e a sua fisiologia (estado de dormência prolongada). Esse molusco possui duas

estratégias distintas de sobrevivência a diapausa e a anidrobiose. A diapausa é induzida por incitações ambientais de valor preditivo, o que permite ao molusco evitar a deterioração dos criadouros no período de seca. Essa fase é caracterizada por uma sequência de eventos na maioria das vezes na fase juvenil, que inclui formação de lamela na abertura da concha, emigrando facilmente da água, seguida de dormência persistente, interrompendo seu crescimento e permanecendo nesse estado até o retorno das condições propícias (Figura 4). A sua capacidade de sobreviver à estação seca, repovoar as coleções de água sazonais, inclusive abrangendo formas larvares de *S. mansonii*, o que torna seu controle mais difícil (BRASIL, 2008). Anidrobiose é um estado de dormência estendida diretamente expulsada pela dessecação do hábitat. Pode acontecer em qualquer fase da vida do molusco, sem haver formação de lamela ou emigração da água. Moluscos em diapausa são maiores resistentes à dessecação do que os em anidrobiose. Na diapausa eles tendem a continuar no estado dormente, ao passo que os últimos retornam de imediato à atividade com o restabelecimento de condições convenientes do ambiente (CARVALHO COELHO; LENZI, 2008). Essas estratégias estão elucidadas na Figura 5.

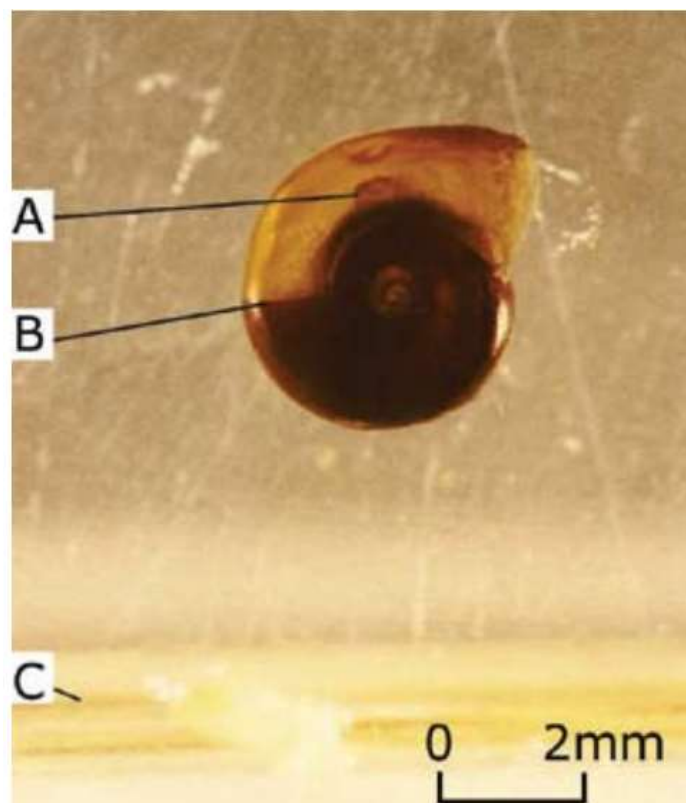


Figura 4 – Espécime juvenil de *B. glabrata* que emigrou da água na ausência de condições adversas do meio, entrando em um estado de dormência persistente (diapausa). A) lamelas próximas à abertura da concha; B) margem externa do corpo retraído na concha; C) lâmina d'água. (Fotografia de Paul Sterry).

Fonte: BRASIL, 2008.



Figura 5 – Estratégias de sobrevivência de *B. glabrata* em habitats sujeitos a secas sazonais.
Fonte: CARVALHO COELHO; LENZI, 2008.

Giovanelli e col. (2001) observaram que o regime de chuvas influencia negativamente a população de moluscos da espécie *B. glabrata*, e durante o período de estiagem parece haver uma maior ocorrência de infecção dos mesmos, devido a sua densidade populacional, assim como a influência da variação sazonal. Corroborando com esse estudo, Oliveira e col. (2016) evidenciaram que no estado de Sergipe, região Nordeste, a presença da *B. glabrata* somente começou a ser observada no início do período chuvoso, mesmo sendo uma coleção permanente, havia dependência das chuvas para que a lâmina de água atingisse toda a área da lagoa, a qual permanece seca em algumas áreas durante alguns períodos. A escassez de chuvas, provavelmente provocou a estivação dos moluscos até que as condições ambientais se apresentassem mais apropriadas.

Segundo Rocha et al., (2016) um estudo feito em duas mesorregiões do Estado de Alagoas, reforçou a importância epidemiológica do gênero *B. glabrata* como o principal hospedeiro intermediário da infecção causada pelo *S. mansoni* nas zonas endêmicas do estado. Devido a sua elevada capacidade de resistência a períodos secos, destaca-se o seu predomínio na região nordeste. Essa característica se difere de outras localidades brasileiras, como por exemplo, em Belém, estado do Pará, que evidenciou a presença do planorbídeo *B. straminea* em 35 dos 70 bairros visitados, onde em 20 já havia a transmissão ativa da infecção (COUTO, 2005).

3.2 *Biomphalaria glabrata*: Aspectos ecológicos e comportamentais

Os moluscos pertencentes ao gênero *Biomphalaria*, são os hospedeiros intermediários da esquistossomose e na natureza apenas três espécies são consideradas transmissoras da doença, sendo elas *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*, que podem ser encontradas em coleções hídricas que constituem possíveis criadouros destes moluscos (DIAS et al., 2013; BALABAN; FRIED, 2013). Essas espécies também demonstram considerável capacidade de resistência e sobrevivência em ambientes muito poluídos, o que certamente é um dos fatores imprescindíveis para a preservação dos riscos decorrentes da transmissão ambiental de *S. mansoni* (SILVA et al., 2006; VRANJAC, 2007; SOUZA et al., 2008).

No Brasil existem no total 11 espécies de *Biomphalaria*, que de acordo com Pepe et al. (2009) apenas as três citadas no quadro 1 são infectadas por *S. mansoni* de forma natural no ambiente.

Quadro 1- Nomes das espécies do gênero *Biomphalaria* e seus respectivos descobridores.

Cientistas/ano		Espécies
1	Say (1818)	<i>B. glabrata</i>
2	Orbigny (1835)	<i>B. tenagophila</i>
3	Dunker (1848)	<i>B. straminea</i>

Fonte: Adaptado de Brasil, 2008c; Pepe, 2009.

Destas espécies, o molusco *B. glabrata* é o mais comum no Nordeste do Brasil (Figura 6) encontrados em coleções hídricas próximas do litoral nos Estados do Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas e Sergipe até o sudeste da Bahia e na Região Sudeste, atinge uma parte de Minas Gerais, o leste do rio São Francisco e o norte do Espírito Santo, além também de focos isolados no Maranhão, Pará, Goiás, São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul (ARAÚJO et al., 2007; SCHOLTE et al. 2012; SILVA et al., 2012).

A espécie *B. glabrata* é encontrada em vários tipos de coleções hídricas desde rios até pequenas valas e lagoas e pequenas poças, são altamente resistentes e adaptáveis a ambientes aquáticos que passam por transformação físico-química, devido a agentes poluidores decorrentes de ação antrópica (BRASIL, 2008c; LEAL-NETO et al., 2013). É considerado de alta potencialidade na transmissão da esquistossomose, em função da sua capacidade de eliminar cerca de 4.500

cercárias/dia, mais de 10 vezes da capacidade de eliminação das outras espécies (SILVA et al., 2006).

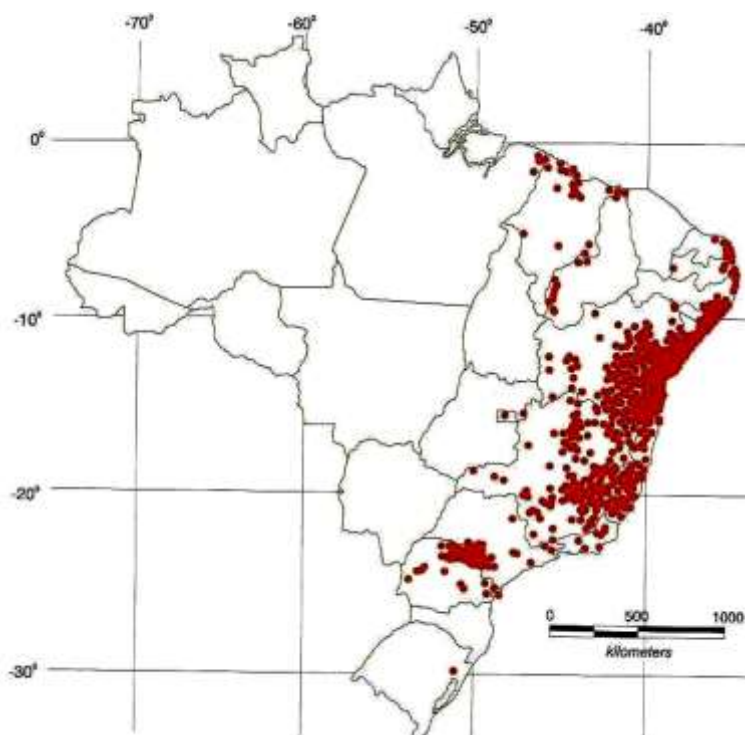


Figura 6 - Distribuição de *B. glabrata* no Brasil.
Fonte: CARVALHO et al. (2008).

O molusco *B. glabrata* possui um alto índice reprodutivo e capacidade de autofecundação essenciais para colonizar qualquer ambiente, gerando a criação de novos focos de transmissão da esquistossomose (SEVILLA, 2010; MELO et al., 2011). Estes fatores são determinantes na disseminação da doença e de importância na compreensão da dinâmica populacional da *B. glabrata*, espécie mais importante no Brasil por apresentar alta suscetibilidade à infecção por *S. mansoni* (BARBOSA; BARBOSA, 1994; XIMENES et al., 2003; GOMES, 2011).

Tibiriça (2008) relata que o molusco pode sobreviver em várias condições adversas no ambiente, como falta de alimentos, baixo teor de oxigênio, altas temperaturas e secas. Um exemplo claro dessa sobrevivência, é o processo de defesa que o molusco desempenha em períodos de estiagem, caracterizado por diapausa e anidrobiose, quando o molusco se retrai para o interior da sua concha, ao entrar novamente em contato com a água, o processo é interrompido (PIERI; JURBERG, 1991; TUAN, 2009).

A relevância do controle dos moluscos, especificamente de *B. glabrata*, no controle da esquistossomose, deve ser associada à melhoria das condições sanitárias

nos ambientes urbanos e rurais, tornando-se necessário uma corrente de pesquisas que estabeleçam medidas médicas e educativas que auxiliem no domínio da doença e do seu hospedeiro intermediário (BRASIL, 2008c; PNUD, 2010).

Em relação ao molusco, vários estudos são realizados na intenção de se obter o seu controle. Na literatura vários autores descrevem e desenvolvem estudos espaciais e químicos, como por exemplo, a aplicabilidade de georreferenciamento, moluscidas sintéticos e naturais no ambiente, visando oportunidades de controlar a magnitude epidemiológica de áreas contaminadas, e, evitar a multiplicação do molusco vetor da esquistossomose, bem como a sua expansão para localidades não endêmicas (PINHEIRO et al., 2003; LEYTON et al., 2005; SILVA et al., 2008; ROCHA et al, 2013).

3.3 Ocorrência do hospedeiro *B. glabrata* em regiões litorâneas

O crescimento e desenvolvimento da área urbana nas últimas décadas marca um novo estágio, onde inclui diferentes preocupações com a saúde, e tem sido responsável pelo aumento das atividades antrópicas sobre os recursos naturais, causando a degradação ambiental (RIBEIRO; VARGAS, 2015). O aumento do consumo de energia, a ausência de esgotamento sanitário, a degradação dos rios, a construção de novas vias e a falta de água nas localidades de grande fluxo turístico como nas áreas litorâneas, representam indicadores que comprovam a interferência do mercado imobiliário no meio natural (CAMPOS; DINIZ; REIS, 2018).

Nos países em desenvolvimento, essa ocupação é particularmente marcada pelo imprevisto e pela falta de estratégias previamente definidas, para o uso e ocupação do solo. Todavia, tais ações contribuem com o acirramento das condições de degradação dos recursos naturais, e como consequência a produção de impactos ambientais nocivos, que pode comprometer a qualidade do meio ambiente (CORRÊA; SILVA, 2015). Essas modificações transgressoras aos espaços naturais e ocasionadas pela especulação imobiliária da dinâmica turística, podem modificar o padrão da transmissão de doenças parasitárias, e aumentar a exposição e o risco de contrair essas doenças para turistas e nativos, a exemplo da esquistossomose (BARBOSA et al., 2018).

A esquistossomose mansônica é uma das mais importantes doenças endêmicas do Brasil, cuja ocorrência está relacionada a pessoas que vivem à margem do desenvolvimento econômico. O homem adquire a esquistossomose através da penetração ativa da cercaria na pele, quando em contato com fontes de água doce que são utilizadas para atividades profissionais ou de lazer e contem a presença de

moluscos infectados pelo *S. mansoni* (KATZ et al., 1972; BRASIL, 2009; ROCHA et al., 2016).

Em distintas localidades litorâneas turísticas do Brasil existem hospedeiros intermediários da esquistossomose, e há registros da transmissão da doença em vários destinos costeiros do país (BARRETO; GOMES; BARBOSA, 2016). Alguns episódios de transmissão e disseminação da esquistossomose por turistas têm sido identificados nos últimos anos na Europa, no ano de 2014 foi relatado o primeiro caso humano da esquistossomose autóctone desde a extinção desta doença na década de 1960. No sul da Córsega, França, um turista alemão foi diagnosticado com *Schistosoma haematobium* após realizar atividade aquática recreativa. Logo após, foram identificados 10 casos idênticos no mesmo local. Relatos existentes também na Itália comprovam migração de paciente com esquistossomose hematóbica na Ilha de Lampedusa (BELLINA, MAUGERI, MISSON, 2009; HOLTFRETER et al., 2014). Segundo ROCA e col. (2002) cerca de 2,5% dos turistas espanhóis podem retornar à Espanha infectados por *Schistosoma*, devido o aumento expressivo de viagens para áreas endêmicas. Esses dados expõem que a esquistossomose é uma doença parasitária de difícil controle, em níveis local/nacional e internacional, por distintos fatores não só de ordem biológica, mas também, sociais, políticos e culturais.

De acordo com Massara et al., (2008), o Brasil não se difere dos outros países, que confirma surtos dessa parasitose em regiões turísticas cada vez mais frequentes. Alguns estudos que comprovam a informação supracitada, já foram feitos nas regiões metropolitanas de Belo Horizonte (Minas Gerais), Recife (Pernambuco), Aracaju (Sergipe) e no interior do Estado de São Paulo (Barbosa et al., 2000; JESUS et al., 2002; ENK et al., 2003; TOMÉ et al., 2003).

No entanto, a esquistossomose não deixou de ser uma endemia eminentemente da área rural, mesmo após o aumento de casos em grandes centros urbanos e regiões litorâneas. O déficit habitacional e as precárias condições de moradia e saneamento retroalimentam a desigualdade social e potencializam a combinação dos riscos de nível domiciliar com os riscos de nível regional e global associados, além dos hábitos socioculturais propícios à endemia nessas regiões (ENK et al., 2010).

Todavia, a avaliação de situações envolvendo a sobreposição de diferentes riscos ambientais nos níveis comunitário/local/regional/global, com a justaposição de seus danos, doenças e agravos de curto a longo prazos, visíveis e invisíveis, constituem a necessidade de se conhecer as condições ambientais dos locais turísticos do Brasil, a exemplo - de praias, como o balneário de Porto de Galinhas, o qual foi destacado com surto epidêmico no estudo de Barbosa et al. (2001), no sentido

de identificar riscos potenciais à saúde, reorganizando e saneando os espaços de modo a prevenir que turistas contraíssem esquistossomose e outras doenças vetoriais (BARBOSA; SILVA; BARBOSA, 1996).

No estado de Pernambuco, a expansão do êxodo de indivíduos de áreas rurais, que são muitas vezes parasitados pelo *S. mansoni*, para localidades turísticas litorâneas cativadas pela numerosa oferta de serviços, aumenta o risco da disseminação da infecção, contaminando as coleções de água doces naturalmente habitadas pelos moluscos hospedeiros da esquistossomose. Essa contaminação ocorre na estação chuvosa devido aos criadouros com moluscos infectados transbordarem provocando a infecção humana de determinada localidade. Panoramas como esses foram exibidos em 12 municípios litorâneos do Estado de Pernambuco, entre eles, o balneário de Porto de Galinhas, em Ipojuca (BARBOSA et al., 2014; LIRA et al., 2017).

A esquistossomose, que hoje é considerada endêmica em Porto de Galinhas, alcançou importante magnitude nas rotas do turismo mundial de 1980. Em 2000, foram registrados 15 focos de transmissão da esquistossomose, e o primeiro surto epidêmico de casos agudos da doença nessa região. A inserção da doença nesse balneário começou com a vinda de trabalhadores rurais que serviram de mão-de-obra para os empreendimentos turísticos, onde os moluscos adentraram na localidade junto com as águas e areias do rio Ipojuca agregadas como material para a obra civil. A ocupação e as alterações daquele espaço turístico, somado as condições climáticas e sanitárias desfavoráveis, foram consideradas como fatores inerentes (BARBOSA et al., 2001).

As condições ambientais de sobrevivência do hospedeiro *B. glabrata* têm sido estudadas há cerca de 20 anos no litoral de Pernambuco. Durante esse período, pode ser considerável que devido à ação antrópica e inserção de agente poluidor no ambiente natural, os ambientes urbanos litorâneos tenham sido modificados na sua formação físico-química. Para que se possa compreender a existência e sobrevivência e distribuição dos hospedeiros transmissores da esquistossomose, é imprescindível estudar os parâmetros que envolvem a qualidade da água, assim como a sua existência em criadouros litorâneos (SILVA et al., 2006).

Conforme Barbosa e col. (2014), no ano de 2008 foram coletados um total de 948 moluscos *B. glabrata* em Goiana, Itamaracá, Paulista e Ipojuca. Os moluscos coletados foram sujeitos à exposição à luz por meio da técnica convencional e apenas as *B. glabrata* de Porto de Galinhas, Ipojuca, se encontravam eliminando cercárias, o número de 485 exemplares com taxa de infecção de 81,4%, o que confirmou persistente transmissão na região. Todavia, no ano de 2014, foi constatado pelos autores que ocorreu uma diminuição da área física de ocorrência da *B. glabrata*, além

disso, da sua densidade populacional, dado que aponta a minimização do risco biológico de transmissão da esquistossomose no litoral de Pernambuco, visto que este é um hospedeiro eminentemente efetivo nesta área. A mudança na ocorrência geográfica de *B. glabrata*, levou-se em consideração a distribuição geográfica e abundância desses moluscos estão sujeitas a variações, diante de mudanças climáticas e ambientais.

Corroborando o estudo de Barbosa et al., (2014), já foi registrado a presença da *B. glabrata* na faixa de areia na praia da Aruanda, localizada no município de Aracaju, Sergipe (CALASANS et al., 2013). Este achado reveste a importância epidemiológica uma vez que esta é uma espécie bem adaptada às condições das áreas litorâneas (Silva et al., 2006) nos quais demonstra ser um excelente hospedeiro da esquistossomose, a exemplo dos elevados índices de positividade que apresentou em determinada região.

3.4 Esquistossomose: *Schistosoma mansoni*, biologia, transmissão e tratamento

A esquistossomose, também conhecida como bilharziose, xistosa e barriga d'água é transmitida por trematódeos do gênero *Schistosoma*, tem o homem como principal hospedeiro definitivo e como principais agentes etiológicos, as espécies *S. mansoni*, *S. haematobium* e *S. japonicum*. Sua distribuição geográfica é determinada pela presença de algumas espécies de moluscos aquáticos do gênero *Biomphalaria* que atuam como hospedeiros intermediários do *S. mansoni* (DIAS et al., 1994).

Mundialmente existem cinco espécies, de importância epidemiológica na área de medicina humana (Quadro 2), porém o *S. mansoni* é a única espécie descrita no Brasil em virtude da inexistência de moluscos suscetíveis aos demais helmintos (KATZ; ALMEIDA, 2003; SOUZA et al., 2011; WHO, 2013).

Quadro 2- Distribuição geográfica e pesquisadores responsáveis pela descrição das espécies de trematódeos do gênero *Schistosoma*.

CIENTISTAS/ ANO	ESPÉCIES	LOCALIZAÇÃO
Bilharz (1852)	<i>S. haematobium</i>	África principalmente (Egito)
Katsurada (1904)	<i>S. japonicum</i>	China, Japão, Ilhas Filipinas e Sudeste Asiático

Sambon (1907)	<i>S. mansoni</i>	África, Antilhas e América do Sul
Fischer (1934)	<i>S. Intercalatum</i>	Interior da África Central
Voge, Brickner & Bruce (1978)	<i>S. mekongi</i>	Vale do rio Mekong, Camboja

Fonte: Informações (NEVES, 2010).

O ciclo biológico do parasito (Figura 7) foi descrito por Lutz, no Brasil, e Leiper, no Egito, independentemente, sendo de grande importância para compreensão da transmissão da esquistossomose, nos fatores categóricos do início e fechamento deste ciclo (NEVES, 2010). Quando, fezes humanas com ovos do *S. mansoni*, infectam coleções hídricas que em condições apropriadas de luz, temperatura e oxigenação estimulam a eclosão dos ovos e saída do miracídio, que são larvas ciliadas que penetram o molusco (hospedeiro intermediário), posteriormente perdem suas estruturas transformando-se em esporocistos primários e secundários, e por fim inicia-se a liberação de cercarias do interior do molusco. As cercarias rompem os tecidos dos moluscos e se exteriorizam no meio aquático e, ao entrar em contato com a pele e/ou mucosa do homem (hospedeiro definitivo), transformam-se em uma nova forma parasitária denominada esquistossômulo, que migra para o tecido subcutâneo até alcançar um vaso sanguíneo para penetrar e alcançar o sistema porta intra-hepático onde se forma os adultos que migram para as veias mesentéricas do intestino e depositam os ovos (NUNES et al., 2005; SOUZA et al., 2011).

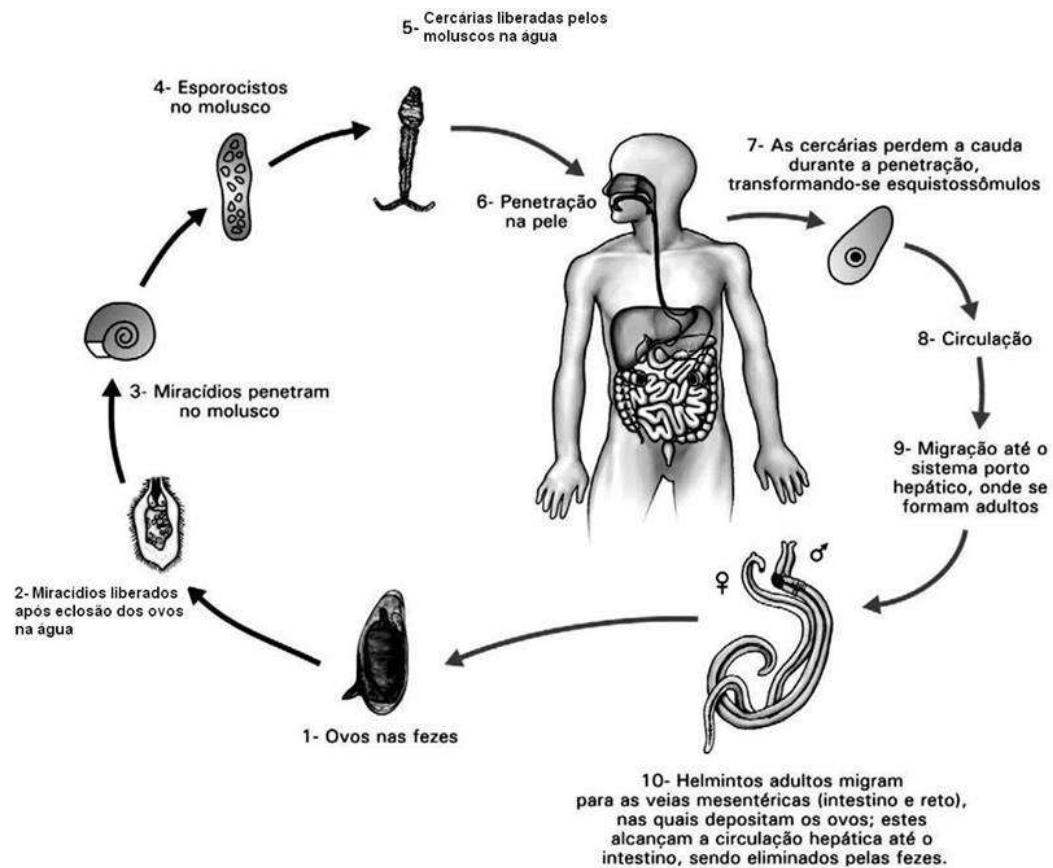


Figura 7- Ciclo biológico de *Schistosoma mansoni*.

Fonte: SOUZA et al. (2011).

A esquistossomose mansônica é uma infecção parasitária que pode evoluir de forma assintomática, no entanto, alguns indivíduos podem desenvolver formas clínicas extremamente graves podendo levar a óbito (BRASIL et al., 2013). A infecção por *S. mansoni* causa quatro formas clínicas, a forma aguda e três formas crônicas, sendo estas intestinais, hepatointestinal e hepatoesplênica, que segundo Fernandes et al. (2013) têm taxas de prevalência associada à morbidade em áreas endêmicas.

A forma aguda da esquistossomose geralmente não se manifesta no organismo de pessoas residentes em áreas endêmicas, porém pessoas originárias de áreas não endêmicas que possuam imunidade baixa poderão apresentar sintomas agudos, devido a nunca ter mantido algum contato com *S. mansoni* (VITORINO et al., 2012). Os autores Vitorino et al. (2012) afirmam ainda, que para um diagnóstico eficaz é relevante que os profissionais da saúde realizem questionamentos aos pacientes no intuito de adquirir informações sobre exposição á coleções hídricas, viagens para áreas endêmicas e o surgimento de sintomas da infecção.

Para o tratamento dos indivíduos portadores da infecção esquistossomótica, é utilizado o medicamento Praziquantel, que depois de ingerido age em uma hora

paralisando os parasitos e danificando o seu tegumento (GRYSEELS et al., 2006). O medicamento apresenta limitações como baixa eficácia no tratamento da esquistossomose mansônica aguda, baixa atividade sobre o *S. mansoni* na forma imatura e falha em tratamentos devido à ocorrência de resistência ou tolerância a esses fármacos (HATZ, 2005; FREZZA et al., 2007).

A utilização do medicamento para o tratamento dos indivíduos que possuem a infecção, não é o suficiente na tentativa de eliminação da esquistossomose, requer muito mais que quimioterápicos no controle da morbidade em áreas endêmicas, são necessárias medidas adicionais em termos de abastecimento de água, controle dos moluscos, saneamento e educação ambiental (KATZ et al., 1993; GRYSEELS, 2012). A melhoria do esgotamento sanitário sempre será a medida integral desejável para ser aplicada no controle e/ou eliminação da esquistossomose (NOYA et al., 2006).

3.5 *Schistosoma mansoni*– taxonomia e morfologia

A esquistossomose é considerada uma doença tropical, muito comum no mundo e uma das principais infecções causadas por helmintos. A doença causada por parasitas trematódeos do gênero *Schistosoma* (Weinland, 1858) que afeta centenas de milhões de pessoas no mundo em desenvolvimento (Lie e Heyneman, 1977; Neves et al. 2001). Os parasitos desse grupo são dióicos (diferentemente da grande maioria dos trematódeos) e apresentam várias etapas do seu desenvolvimento, tendo um ciclo heteroxênico (Souza et al. 2011). No Brasil, essa infecção é um problema sério em questão de saúde pública, tendo como única e principal espécie causadora da doença, a espécie *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, que utiliza o ser humano como hospedeiro definitivo e o molusco *Biomphalaria glabrata* como hospedeiro intermediário (Souza et al. 2011). *S. mansoni* se diferencia taxonomicamente de outras espécies patogênicas ao homem, como *S. japonicum* e *S. haematobium* principalmente por questões morfométricas e pela morfologia dos ovos (Figura 8), esses por vez, apresentam uma espícula na região póstero-lateral do ovo (Machado et al. 1998; Neves et al. 2001; Oliveira et al 2003).

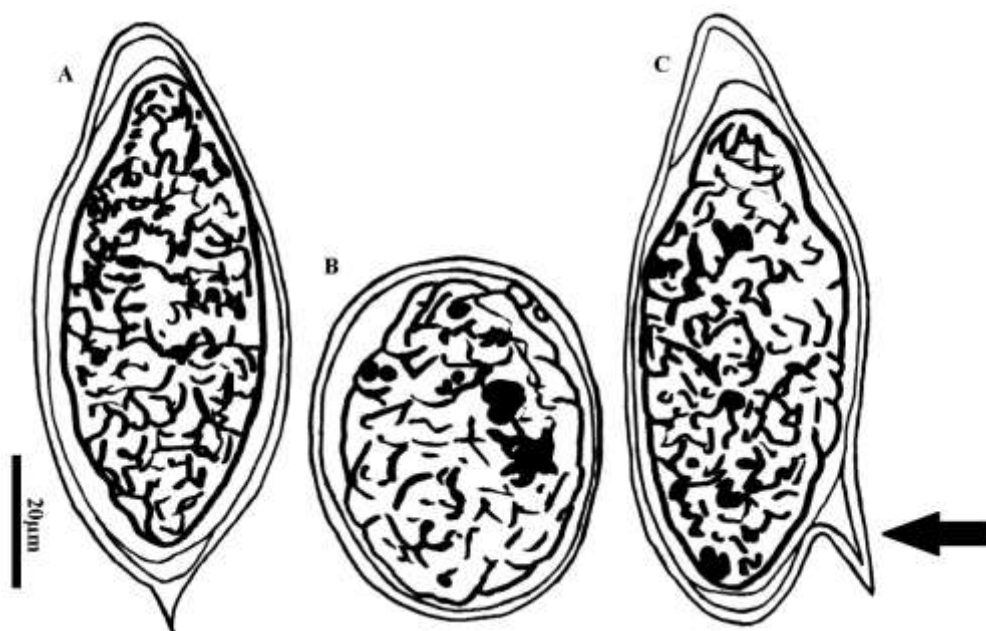


Figura 8- Ilustração morfológica comparativa entre os ovos de *Schistosoma haematobium* (A), *S. japonicum* (B) e *S. mansoni* (C), seta aponta a espicula póstero-lateral do ovo.
Fonte: Ilustração de André Mota.

Frandsen (1979) explica que, além disso, outras características como desenvolvimento do intestino e seus cecos, o padrão do sistema de glândulas vitelínicas, o número de testículos e a posição do ovário, servem para diferenciação das espécies. Existem poucas espécies de *Schistosoma* no mundo e a quantidade de características morfológicas que podem diferencia-las é ainda menor, algumas como *S. haematobium* são divididas em linhagens e possuem variações quanto ao hospedeiro intermediário, devido a isso a validade de algumas espécies descritas ainda é incerta.

3.6 Ciclo de vida e relação parasita/hospedeiro

A descrição do ciclo biológico é baseada em descrições de Barbosa (1995) e Souza et al. (2011). Os vermes adultos (Figura 9) que permanecem acasalados realizam a postura dos ovos, que atingem o exterior juntamente com o bolo fecal. Os ovos inicialmente (não maduros) possuem um conteúdo não clivado, após 6-7 dias tornarem-se maduros, possuindo um miracídio (estágio larval) formado em seu interior (Figura 10).

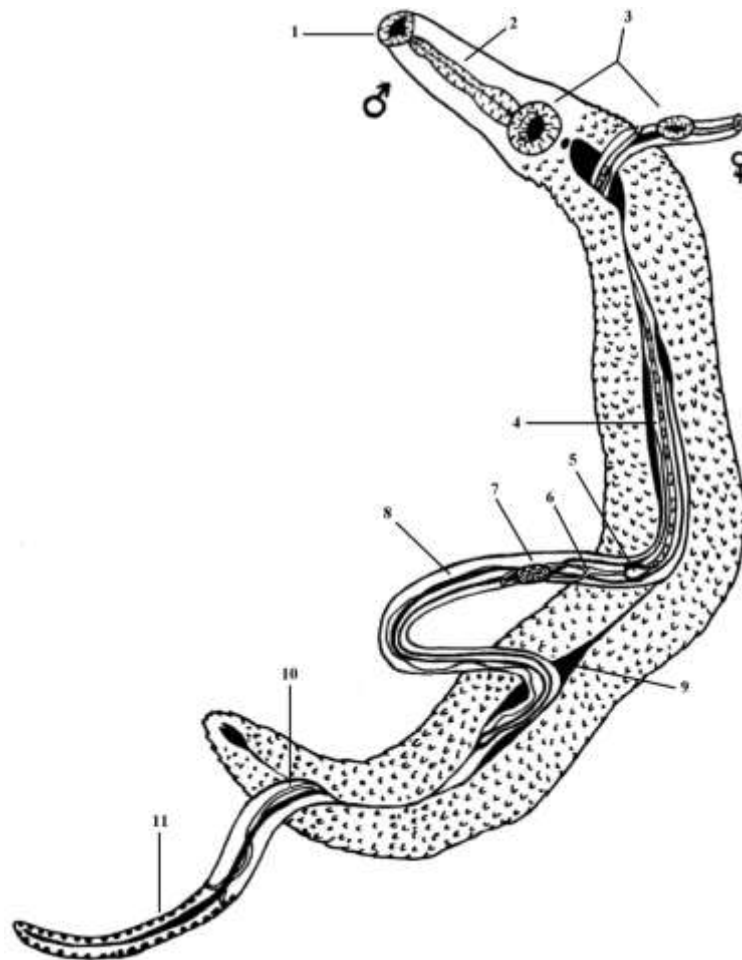


Figura 9 - Adultos acasalados de *Schistosoma mansoni*. 1- Ventosa oral; 2- Esôfago; 3- Acetábulo; 4- Útero; 5- Ootipo; 6- Oviduto; 7- Ovário; 8- Cecos Intestinais; 9- Canal ginecóforo; 10- Ducto vitelínico; 11- Glândulas vitelínicas.

Fonte: Ilustração de André Mota.

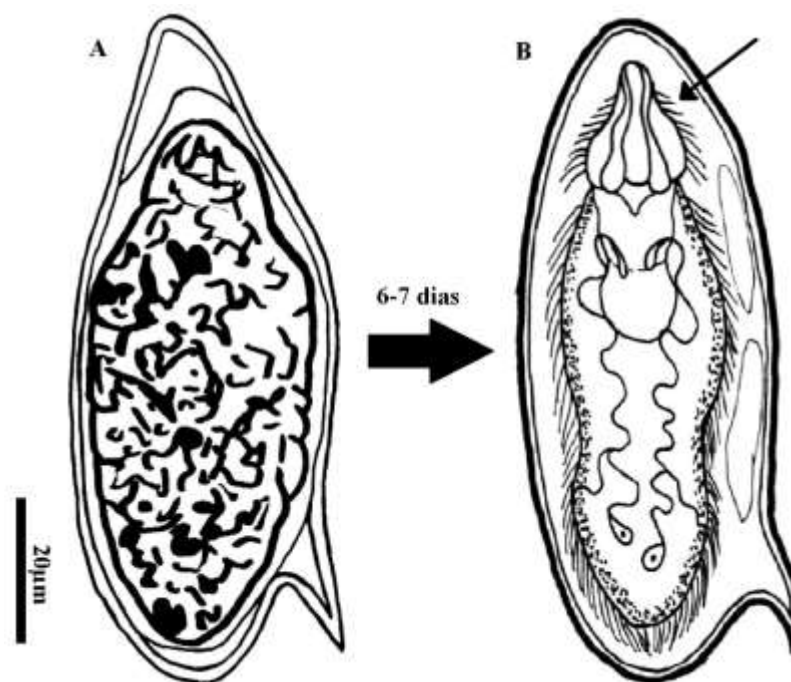


Figura 10. Ilustração de estágios de ovo de *Schistosoma mansoni*. A- Ovo imaturo, com conteúdo não clivado; B- Ovo maduro, seta aponta o miracídio no interior.
Fonte: Ilustração de André Mota.

Os ovos, quando atingem a água, a depender de fatores ambientais como temperatura, intensidade de luz e taxa de oxigenação na água, liberam o miracídio. Após liberados na água, os miracídios, através de uma estrutura sensorial, o terebratorium, detectam substâncias difundidas no meio aquático, que são emitidas pelos moluscos (que podem ser dos gêneros *Biomphalaria*, *Helisoma* e *Lymnea*), sendo considerado como um processo atrativo.

Ao entrar em contato com o molusco o terebratorium assume a forma de uma ventosa, fixando-se no tecido com auxílio de glândulas de adesão. O miracídio por comando das vibrações ciliares e da musculatura subepitelial se agita e se contrai intensamente. Durante esse processo, as glândulas de penetração descarregam enzimas proteolíticas que digerem os tecidos. A combinação da ação digestiva das enzimas e da ação motora faz com que o miracídio penetre nos tecidos do hospedeiro. O epitélio é ultrapassado e a larva se estabelece no tecido subcutâneo. Uma vez instalado no molusco, o miracídio perde os cílios e transforma-se em esporocisto primário (a rédia) e depois por poliembrionia da origem a esporocistos secundários. Cada esporocisto, por reprodução assexuada, dá origem a várias cercárias (outro estágio larval) que possui uma cauda bifurcada (Figura 11A, seta 3), usada para movimentação quando liberada na água. As cercárias são “liberadas” por vesículas no tegumento do molusco, que se rompem e liberam estas formas larvais. Estas por vez ficam livres na água, nos horários mais quentes e com maior intensidade luminosa, e

nadam ativamente usando a cauda bifurcada até encontrarem um hospedeiro, preferencialmente o ser humano, seu hospedeiro definitivo.

Ao alcançar a pele de um ser humano, a cercaria fixa-se com a ajuda de suas ventosas (Figura 11A, setas 1 e 2) e penetram a pele de forma similar a que os miracídios penetram os moluscos. Ao penetrar a pele, a cercaria perde a cauda e transforma-se em uma metacercária, o esquistossômulo (Figura 11B) (uma forma semelhante a cercaria, diferindo na ausência da cauda), esses migram pelo tecido subcutâneo, penetram um vaso sanguíneo e permanecem na corrente sanguínea até alcançarem as alças intestinais do sigmoide e do reto. Os esquistossômulos se dirigem para o sistema porta intra-hepático, por fluxo sanguíneo, e lá se alimentam e se desenvolvem em formas dioicas (macho e fêmea) (Figura 12A,B). Após isso, os parasitos acasalam-se (Figura 12C) e migram dessa forma até a artéria mesentérica inferior, para realizar a oviposição.

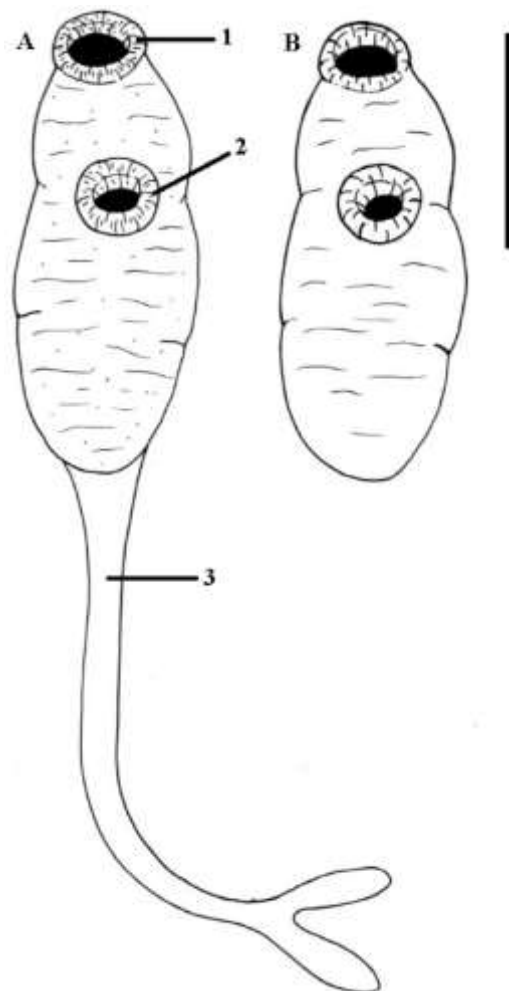


Figura 11 - Ilustração de aspecto morfológico de cercaria (A) e esquistossômulo (B). 1- Ventosa oral; 2 – Acetábulo; 3- Cauda bifurcada.

Fonte: Ilustração de André Mota.

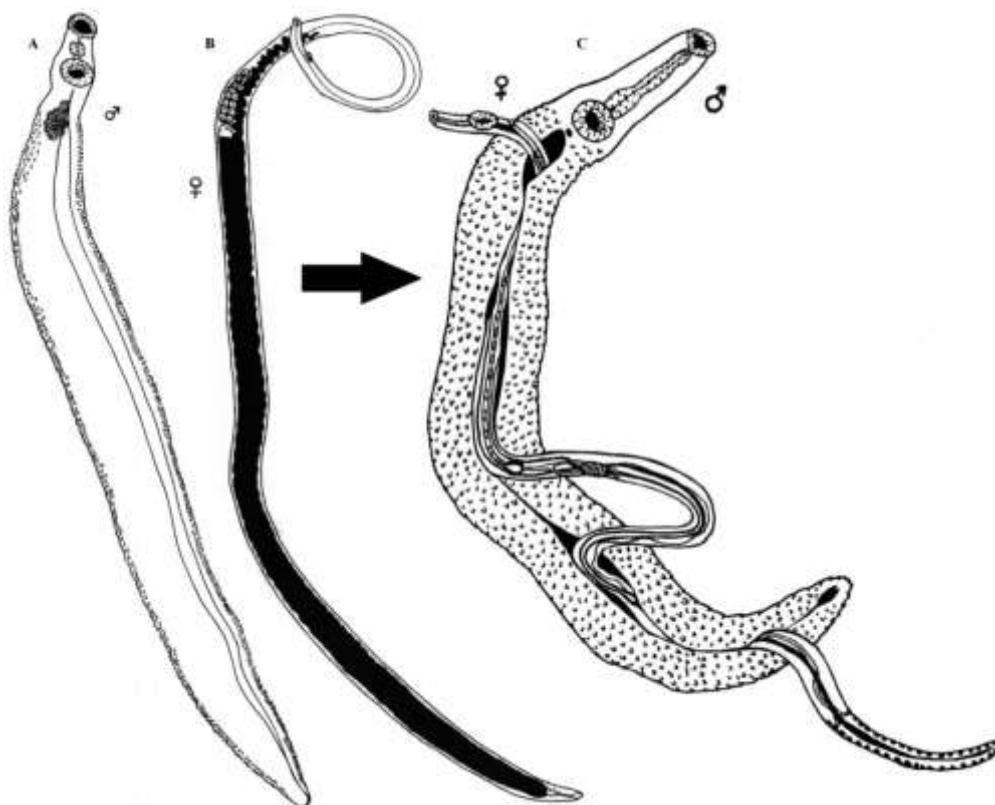


Figura 12 - Formas dioicas de *Schistosoma mansoni*. Macho (A) e Fêmea (B); C- Formas dioicas acasaladas.

Fonte: Ilustração de André Mota.

3.7 Epidemiologia da esquistossomose

A esquistossomose mansônica é uma doença infecto-parasitária negligenciada, com prevalência mundial, endêmicas em áreas tropicais de 76 países e territórios localizados na África, América Latina, Oriente Médio e no continente Asiático (OLIVEIRA et al., 2008; ZHANG et al., 2010), cerca de 207 milhões de pessoas estão infectadas em todo o mundo (GRAY et al., 2010), correspondendo a casos sintomáticos e forma grave da doença (CHITSULO et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2013). Continua a ser um problema de saúde pública global, onde aproximadamente 200 milhões de pessoas estão infectadas por parasitos do gênero *Schistosoma*, e 20 milhões sofrem de graves complicações (GRENFELL et al., 2013).

No Brasil cerca de 30 milhões de pessoas estão expostas ao risco de contrair a esquistossomose e outras 6,3 milhões sejam portadores da forma intestinal da doença, a maioria oriunda da Região Nordeste do país (PALMEIRA et al., 2010). Sendo acometidas pelo *S. mansoni* 2,5 a 6 milhões de pessoas (SANTOS; MELO, 2011). Esses dados são coerentes com o relato de Katz e Almeida (2003) que

descrevem o Brasil como uma das maiores regiões endêmicas no mundo. A endemia abrange 19 unidades federativas, sendo que nos Estados do Nordeste encontramos os maiores índices de prevalência da parasitose, destacando os estados de Alagoas, Sergipe, Bahia e Pernambuco (SANTOS; MELO, 2011).

Do ponto de vista histórico, a esquistossomose mansônica é uma doença que existe há milhares de anos, pois foram encontrados ovos calcificados de *S. mansoni* em rins de múmias egípcias (PARISE-FILHO et al., 2001). A introdução da doença no Brasil aconteceu a partir de meados do século XVI, com a chegada de populações africanas em regime de escravidão para trabalhar na cultura de cana na região Nordeste, a partir daí a esquistossomose teria se expandido rapidamente pelo Nordeste e o resto do país (SILVEIRA, 1989).

O levantamento histórico realizado sobre a prevalência da esquistossomose revela o Estado de Sergipe endêmico para esquistossomose (KATZ; PEIXOTO, 2000). Posteriormente, Coura e Amaral (2004) realizaram pesquisas sobre a prevalência da esquistossomose nos Estados brasileiros, mostrando que o Estado de Sergipe teve uma pequena diminuição de casos de esquistossomose, entretanto continua classificado como de alta endemicidade.

Os autores Cunha e Guedes (2012) revelaram no seu estudo com base no programa de controle da esquistossomose, que no período de 2001 a 2006, foram notificados em Sergipe 73.106 casos, destes 2.143 foram no município de Nossa Senhora do Socorro. Rollemberg et al. (2011), relataram que no ano de 2007 oito municípios apresentaram notificações de casos para esquistossomose, sendo estes, Umbaúba, Riachuelo, Maruim, Siriri, Japoatã, Santa Rosa de Lima, São Cristóvão, Ilha das Flores, e no ano de 2008 os municípios de São Cristóvão, Ilha das Flores e Muribeca, ressaltando que todos os municípios apresentavam condições sanitárias propícias para disseminação da doença que prejudicavam a saúde das populações que habitavam as localidades.

Segundo o Sistema de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, a prevalência humana do Estado de Sergipe, em 2010, foi de 6,7% em 27.256 pessoas examinadas. A média anual de internação, no período de 2005 a 2010, regrediu de 1,58 em 2005 para 0,44 em 2010 (17 internações por 100 mil habitantes), sendo que a taxa de mortalidade por 100 mil habitantes, manteve-se em 0,86 nesse período (BRASIL, 2011b). O objetivo desse sistema de vigilância em saúde é desenvolver estratégias de monitoramento, prevenção e controle da esquistossomose, referente aos seus efeitos sobre a população e o ambiente, na tentativa de, reduzir os óbitos e evitar a dispersão da doença (BRASIL, 2008c; BRASIL, 2011b).

A esquistossomose se encontra entre as infecções parasitárias que apresenta aumento de áreas de abrangência a nível mundial, a infecção preferencialmente rural, alcança de forma preocupante outras regiões, onde o homem é o maior facilitador para que a doença atinja os meios urbanos, geralmente periféricos, no qual, as pessoas se alojam de forma desordenada, sem infraestrutura de saneamento básico. A modificação desses ambientes e o processo migratório fornecem para a esquistossomose e seu hospedeiro, um habitat novo e propício para sua instalação e dispersão (SILVA, DOMINGUES, 2011; CAMARGO; BOAVENTURA, 2014).

A ocorrência de maior número de casos da parasitose acomete adolescentes e adultos com faixa etária entre 15 e 19 anos e indivíduos 20 aos 39 anos, considerando estarem mais susceptíveis a infecção devido a atividade laboral dos mesmos (VASCONCELOS et al., 2009; CARDIM et al., 2011). Os autores Palmeira et al.(2010) obtiveram dados em que a faixa de idade positivos para *S. mansoni* compreendeu entre os 6 aos 20 anos de idade, a maioria do sexo masculino e vivendo a margem do desenvolvimento econômico.

3.8 Esquistossomose e fatores socioeconômicos e ambientais

A esquistossomose é uma infecção parasitária negligenciada, decorrente da insuficiência de políticas destinadas à promoção e educação em saúde, e da ausência ou pouco investimento em saneamento básico e ambiental, que gera um grave problema de saúde pública (CARDIM et al., 2011; LEAL-NETO et al., 2012). É relevante analisar o contexto social, voltado principalmente para as populações que vivem à margem do desenvolvimento econômico (SILVEIRA; SARTORI, 2011).

A maioria da população menos privilegiada economicamente habita áreas com precárias condições de higiene, pois se aglomeram em espaços inapropriados (BARBOSA et al., 2000; CUNHA; GUEDES, 2012). Estes espaços encontram-se em expansão devido ao processo migratório de comunidades rurais para urbanas, que acabam esquecidas pelo poder público, facilitando assim a introdução e/ou reintrodução da esquistossomose e sua disseminação em locais endêmicos ou não para a infecção (COIMBRA-JUNIOR et al., 1984; BARBOSA et al., 1998; LEAL-NETO et al., 2012). Para Vidal et al. (2011) esses fatores ocorrem devido a um perfil desordenado na distribuição de riquezas, atenção à saúde e as condições socioeconômicas e culturais que são importantes causas de morbimortalidade entre os brasileiros, gerando um grande impacto social referente a pobreza e à qualidade de vida das pessoas.

Nos países em desenvolvimento, especialmente o Brasil, a esquistossomose tem se expandido também devido a outros fatores como o turismo rural que facilita a infecção de indivíduos que viajam para áreas endêmicas sem as devidas informações em relação às doenças que podem ser contraídas nesses locais (ROCHA et al., 2000; VASCONCELOS et al., 2009; MASSARA et al., 2012).

Os fatores socioeconômicos e sociodemográficos foram e continuam sendo decisivos na transmissão de doenças, se fazendo imprescindível a implementação de políticas sociais e econômicas que possam interferir de maneira positiva na transmissão de doenças (LIMA, 2013) uma vez que, a Constituição Federal de 1988, assinala que a saúde é um direito de todos e um dever do Estado. Desta forma, é dever do Estado garantir políticas sociais e econômicas que visem à redução do risco de doenças e de outros agravos e ao mesmo tempo o acesso universal igualitário às ações e serviços para sua promoção, proteção e recuperação da saúde (GARBOIS et al., 2008; WALDMAN, 2011).

A reemergência da esquistossomose está intimamente ligada as grandes densidades populacionais, sobreviventes em espaços reduzidos, impróprios para habitação, com saneamento inadequado e muitas vezes ausente, no que se refere abastecimento de água, sistemas de esgotamento sanitário, destinação de resíduos sólidos e infraestrutura, são fatores predominantes no surgimento da doença, que tem relação direta com o ambiente degradado (LIMA, 1995; TIBIRIÇA et al., 2011).

O conveniente é conhecer e analisar as ações antrópicas no âmbito físico, biológico, social e cultural que venham facilitando a transmissão e permanência da esquistossomose, seja em áreas rurais ou urbanas (MORAIS et al., 2014). O estabelecimento da esquistossomose em uma determinada região dependerá da atuação humana no ambiente conjugado ao carecimento no saneamento básico, desempenhando papel fundamental na formação e ampliação de criadouros dos moluscos, participantes no ciclo biológico do parasito responsável pela infecção humana (SOUZA et al., 2010).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda para saúde a participação da população como tática funcional no controle da esquistossomose, entretanto, no Brasil são poucos os projetos, no qual a população tenha participado de forma ativa neste processo (COURA-FILHO et al., 1992). O Programa de Controle da Esquistossomose (PCE) foi criado, inicialmente com o propósito de realizar o tratamento, controle de vetores, saneamento básico e educação sanitária com participação da comunidade, entretanto, deixou de atuar com essas medidas, passando apenas a efetuar o diagnóstico e fornecer tratamento aos infectados (COURA-FILHO, 1997; SARVEL et al., 2011).

O tratamento da esquistossomose envolve muito mais que apenas tratar os infectados, necessita de envolvimento articulado em ações de conscientização e educação ambiental da população, controle malacológico e investimentos no saneamento básico, além de planejamento urbanístico que busquem não comprometer a saúde das pessoas (SILVA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2013).

É relevante destacar que os procedimentos inadequados de implantação e manutenção dos serviços de água e esgoto causam impactos negativos sobre o meio ambiente, e conseqüentemente na saúde das pessoas (PALIALOL, 2014). Assim, estes fatos facilitam a transmissão de várias doenças hídricas, como a esquistossomose (SANTOS; MELO, 2011).

A concepção saúde e doença estão diretamente ligadas à organização da sociedade, logo se faz necessário à compreensão de determinantes sociais, como um todo, a fim de se tentar reverter a situação de negligência da esquistossomose, necessitando de medidas públicas que garantam qualidade para população, bem como a efetiva participação da população de forma mais consciente e ciente da gravidade da infecção (KATZ, 1999; LEAL-NETO et al., 2013; GOMES et al., 2014).

4 CAPÍTULO II - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Áreas de Estudo

O estudo realizado no município de Aracaju (SE) situada no nordeste brasileiro. Possui uma população de aproximadamente 650.106 habitantes, sendo sua área territorial de 3.140,65 km² (IBGE, 2018). Foram investigados: um ponto na zona litorânea, denominado de Praia, que está localizado na Aruanda em Aracaju e um segundo ponto denominado de Rural localizado no município de São Cristóvão (figura 13), região metropolitana de Aracaju a 26 km da capital, é constituído por 89.027 habitantes com densidade demográfica de 180,52 hab/km². Ambas as áreas, apresentam clima tropical quente e úmido, com temperaturas anuais médias de 26°C, e com nível de precipitação de 1695 mm, com um a três meses de estiagem que vai de janeiro até início de março e inverno caracterizado por um período de chuva entre os meses de março a agosto (IBGE, 2018).

O mapeamento georeferencial das áreas foi realizado utilizando um receptor GPS (Garmin, modelo Vista Cx) para marcação dos pontos: Praia (S11° 01.193' W037° 04.291') & Rural (S11° 00.170' W037° 12.648') configurado no sistema de projeção geográfica SIRGAS 2000 UTM. Os pontos foram selecionados aleatoriamente com base na ocorrência de *Biomphalaria* sp., no perímetro urbano e rural dos municípios.

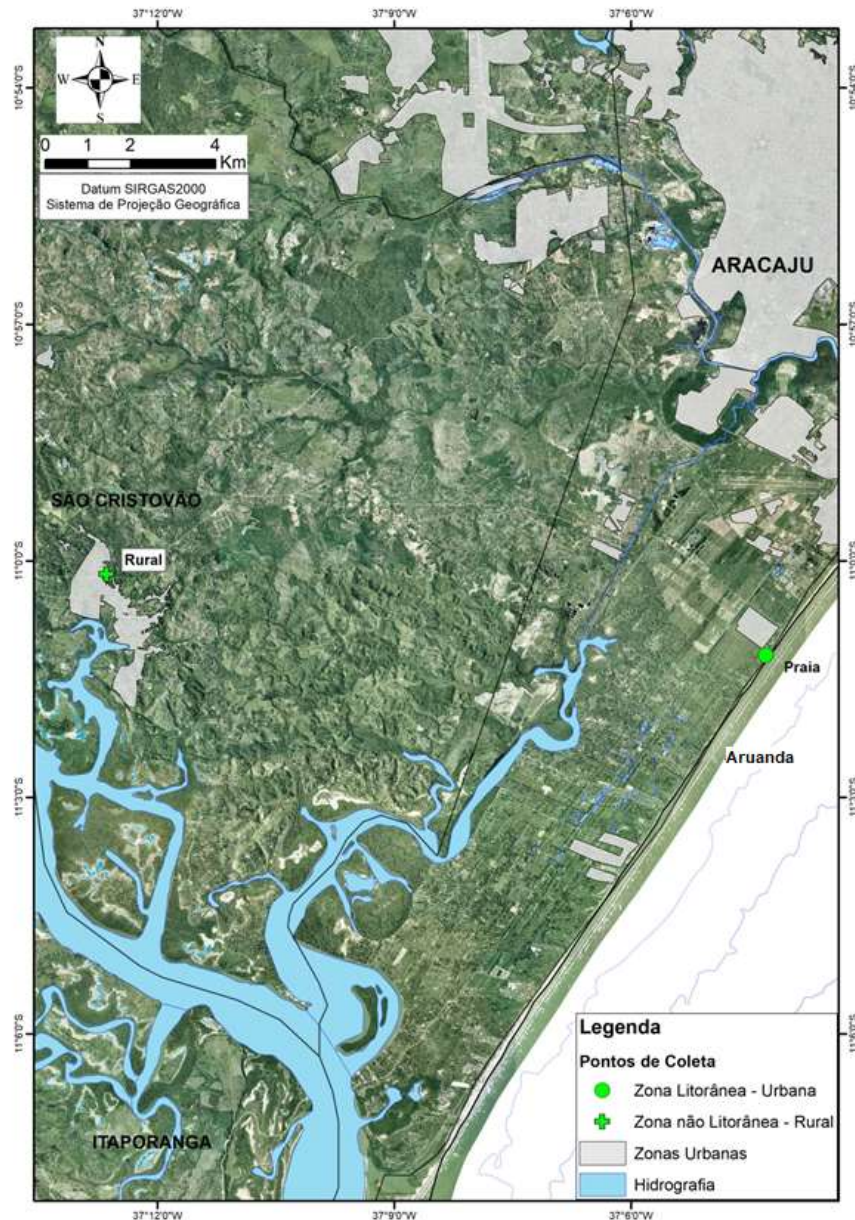


Figura 13 - Localização das áreas de estudo e respectivos pontos de coleta malacológica situados em área urbana da praia de Aruanda (Zona litorânea) de Aracaju e área rural no município de São Cristóvão, região metropolitana. Fonte: Software ArcGIS 10.

4.2 Dados pluviométricos

Os dados de pluviosidade foram obtidos na Secretaria de Recursos Hídricos do Estado de Sergipe (SRH-SE).

4.3 Análises físico-químicas e microbiológica da água

Os parâmetros físico-químicos das coleções hídricas dos pontos de coleta foram analisados *in situ* como, por exemplo, pH, temperatura, salinidade, sólidos totais dissolvidos e condutividade elétrica, utilizando-se um multianalisador uma sonda multiparâmetros HANNA HI 9828. Essa análise ocorreu mensalmente durante o inquérito malacológico.

As coletas de água para o microbiológico ocorreram trimestralmente, abrangendo os períodos de estiagem e chuvoso. Durante as coletas foram utilizados recipientes de vidro incolores, boca larga com capacidade de 100 mL, previamente esterilizados, para evitar possíveis contaminações. Posteriormente, as amostras foram acondicionadas em caixas térmicas, mantidas em resfriamento, com barras de gelo e posteriormente guardadas em refrigeração a 4°C até o momento das análises (APHA, 2012). O procedimento de análise microbiológica ocorreu em laboratório, no qual foi usada a metodologia de Substrato Cromogênico/Enzimático SMEWW, 22^a Ed. 9223 B que usa substrato constituído de sais, fontes de carbono e nitrogênio, indicadores e nutrientes específicos para a detecção simultânea de coliformes totais e termotolerantes. As amostras coliformes positivas são detectadas visualmente por desenvolvimento de cor amarela no meio de cultura, sendo a presença de *Escherichia coli* (coliformes termotolerantes) detectada pela observação de fluorescência sob a luz UV (SOUZA et al., 2015).

4.4 Análise do sedimento

A análise do sedimento foi importante para enfatizar o papel que este componente tem no processo de fixação do hospedeiro intermediário em ambientes costeiros e interioranos, pois sendo seres detritívoros, os moluscos utilizam também substâncias do sedimento para auxiliar na sua alimentação (BARBOSA; BARBOSA, 1994). Os sedimentos foram coletados trimestralmente em vários pontos das margens dos corpos d'água com ajuda de espátula de aço inoxidável, misturados, homogeneizados e guardados em sacos plásticos. Coletadas duas amostras na estação seca e duas na estação chuvosa. As amostras foram secas em estufa a 100°C por 24h, e finalmente pulverizadas ($\approx$ 200mesh) com um almofariz e pistilo de ágata.

4.5 Coletas de moluscos

Em um tempo esforço de 2 horas/homem, os moluscos foram coletados mensalmente no período de junho de 2015 a julho de 2017, com o auxílio de peneiras e pinças, e em seguida transportados em recipientes plásticos identificados com data e local. Posteriormente, no Laboratório, os moluscos foram colocados em aquários e alimentados com folhas de alface. Os moluscos foram quantificados e medidos o comprimento da concha, com auxílio de paquímetro digital (Messen 150 mm ISO9001: 2000), para verificar a existência de diferenças de comprimento e as variáveis ambientais.

Paralelamente, uma amostra de quatro moluscos de cada ponto de coleta foi escolhida aleatoriamente para identificação específica da espécie, por meio de avaliação da morfologia externa da concha e dissecação para visualização da morfologia interna (BARBOSA, 1995).

4.6 Análises parasitológicas

Para descrever a possível infecção por *S. mansoni* foi considerado positivo o molusco que estivesse eliminando cercárias do parasito. Para realização dessa análise, os moluscos foram isolados em frascos de vidro transparente com 4 ml de água dechlorada e/ou filtrada, e expostos à luz de lâmpadas incandescentes (60W) a uma distância de 30 cm, durante 4 horas. Tal procedimento fornece uma temperatura entre 28 e 30°C, capaz de estimular a emissão cercariana (BRASIL, 2008). Moluscos negativos eram reexaminados usando a mesma técnica, 15 dias após a primeira exposição.

A taxa de infecção natural (TIN) foi determinada através da fórmula:

$$TIN = N^{\circ} \text{ de moluscos parasitados} / N^{\circ} \text{ de moluscos coletados} \times 100.$$

4.7 Gradiente de salinidade

O encontro de hospedeiros em coleções hídricas ocasionadas pelo despejo de águas pluviais e domiciliares na praia ocasionou o questionamento a respeito da sobrevivência dos mesmos, nestes locais. Não foram encontrados estudos que relacionassem a salinidade dos ambientes à sobrevivência de hospedeiros. Para se testar o efeito do gradiente de salinidade sobre sobrevivência dos mesmos, foi realizado um experimento esquematizado na Figura 14. Ressalta-se que foram submetidos ao teste os moluscos encontrados no ponto da área da praia (zona litorânea), e os moluscos de área rural.

Todas as amostras de água para este experimento passaram por autoclave para diminuir o efeito de agentes microbiológicos, sem alterar o efeito químico da salinidade. Os ensaios foram efetuados em triplicata, por ponto de coleta, e se iniciaram com a medida da variação da salinidade entre a água do mar e a menor salinidade encontrada em água doce. Com diluições realizadas (a cada 5%) da água do mar.

Os moluscos foram submetidos a uma serie experimental, onde foram inseridos 10 moluscos em cada recipiente. A sobrevivência destes organismos foi monitorada por vídeo, para documentação (Figura 14). O grupo controle foi aquele que possuiu a mesma salinidade observada na água doce (habitat usual dos hospedeiros).

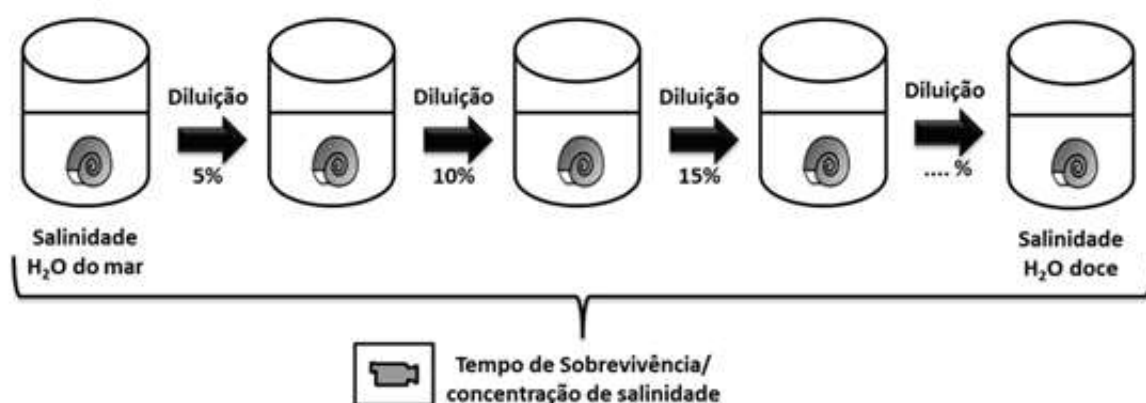


Figura 14 - Teste da influência do gradiente de salinidade nos moluscos *B. glabrata*, coletados na praia de Aruanda no município de Aracaju e de área rural endêmica para a esquistossomose no município de São Cristóvão, Sergipe.

4.8 Extração de proteínas

Os moluscos foram separados e nomeados em dois grupos: Grupo MP = Molusco Praia e Grupo MR = Molusco Rural, e para cada grupo 4 exemplares de *B. glabrata*. Posteriormente foram encaminhadas ao Instituto de Biologia Animal da Universidade Estadual de Campinas, para realização da extração proteica. A extração foi realizada a partir dos tecidos do manto completo dos moluscos. Os mantos foram cortados e picotados sobre o gelo seco e submetidos ao tampão de extração em solução. Foi adicionada 300µL de tampão de Lise para inibição de protease (pH 8.1 contendo Uréia 8M, Tris 50mM). As amostras foram homogeneizadas para rompimentos das células e liberação das proteínas utilizando um aparelho Politron de alta frequência e encaminhadas à centrifugação a 15.000g por 15min ajustado a uma temperatura de 4°C. O sobrenadante contendo as proteínas foi recuperado e armazenado a -80°C.

A digestão com tripsina de proteínas para espectrometria de massas (LC-MS/MS) foi realizada utilizando procedimento previamente descrito por Vergote et al. (2005). Para isso, as amostras foram tratadas com uréia na concentração final de 1,6 M, seguido por redução das proteínas com ditioneína (DTT) a 5 mM por 25 minutos a 56°C, alquilação com iodoacetamida (IAA) a 14mM por 30 minutos a temperatura ambiente e protegido da luz, adição de 1mM de cloreto de cálcio e em seguida digestão com tripsina por 16h a 37°C (proporção enzima: substrato, 1:50). A reação foi interrompida com ácido fórmico a 0,4% e as amostras submetidas à remoção de sais por meio de stage tips coluna C18 (RAPPSILBER et al., 2007). A remoção de sais das amostras consiste em condicionar a coluna com metanol 100%, equilibrar com ácido fórmico 0,1%, carregar as amostras, lavando com ácido fórmico 0,1% e eluir com uma solução de acetonitrila 80%/ ácido fórmico 0,1%. As amostras foram então submetidas à secagem em um concentrador a vácuo e armazenadas a -20°C para posterior análise no espectrômetro de massas.

4.9 Análises estatísticas e bioinformática

Artigo 1- Os dados foram descritos por meio de média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo. Diferenças de média foram avaliadas por meio de teste T e teste de Mann-Whitney. Tamanhos de efeito d de Cohen foram calculados para determinar a magnitude das diferenças (RICE, HARRIS, 2005). O experimento foi analisado com um modelo linear geral. Foram calculados R^2 e R^2 ajustado para avaliar adequação do estudo. São propostos pontos de corte letais para diluição que foram avaliados por Curva ROC e Área abaixo da curva (AUC). Os critérios de seleção dos pontos foram o Índice de Youden (J), Proximidade do ponto (0,1) (ER), Índice de União (IU) e Probabilidade de Concordância (CZ) (UNAL, 2017).

Artigo 2 - Os dados obtidos na espectrometria de massas foram processados nos programas *MaxQuant* v1.3.0.3 para identificação das proteínas e submetidos a buscas de números de acessos no VectorBase, NCBI e Uniprot para o Gene Ontology (GO). No programa *Perseus* v. 1.2.7.4 realizado Student's *t*-test para diferenças significativas na intensidade das proteínas entre os grupos estudados, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$) e a ferramenta online Clustvis para visualizar o clustering dos dados (METSALU, VILO, 2015).

..

5 REFERÊNCIAS

- CAP ARAÚJO, K.C.G.M; RESENDES, A.P.C; SOUZA-SANTOS, R; JÚNIOR, J.C.S. BARBOSA, C.S. Análise espacial dos focos de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) e de casos humanos de esquistossomose mansônica em Porto de Galinhas, Pernambuco, Brasil, no ano 2000. *Cad. Saúde Pública* 2007. 23(2): 409-417.
- BALABAN, A.E; FRIED, B. Maintenance of *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni* in Artificial Spring Water, Deionized Water, or Conditioned Tap Water. *Comp. Parasitol* 2013. 80(1): 118–119.
- BARBOSA, C. S; DOMINGUES, A. L. C; ABATH, F; MONTENEGRO, S. M. L; GUIDA, U; CARNEIRO, J; TABOSA, B; MORAES, C. N. L; SPINELLI, V. Epidemia de esquistossomose aguda na praia de Porto de Galinhas, Pernambuco, Brasil. *Cad. Saúde Pública* 2001. 17, 725-728.
- BARBOSA, C.S; BARBOSA, V.S; MELO, F.L; MELO, M.S.B; BEZERRA, L; CAMPOS, J.V; RODRIGUES, B.X; NASCIMENTO, W.C; GOMES, E.S; LEAL-NETO, O; DOMINGUES, A.L. Autochthonous cases of schistosomiasis in children in Recife, Northeast ern Brazil. *Rev Saúde Pública* 2013, 47(4): 684-90.
- BARBOSA, C.S; GONÇALVES, J.F; ALBUQUERQUE, Y; BARBOSA, F.S. Urban schistosomiasis in Itamaracá Island, Pernambuco, Brazil: Epidemiological factors involved in the recent endemic process. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1998; 93: 265-266.
- BARBOSA, C.S; PIERI, O.S; SILVA, C.B; BARBOSA, F.S. Eco epidemiology of urban schistosomiasis in Itamaracá Island, Pernambuco, Brazil. *Rev Saúde Pública* 2000; 34(4): 337-41.
- BARBOSA, F.S. *Tópicos em Malacologia Médica*. Rio de Janeiro, Fiocruz, 1995.
- BARBOSA, F.S; BARBOSA, C.S. The bioecology of snail vectors for schistosomiasis in Brazil. *Cad. Saúde Pública* 1994. 10(2): 200-209.
- BARBOSA, C.S; GOMES, E.C.D.S; LOYO, R.M; CAVALCANTI, M.I.S.B.D; SILVA, I.E.P; ALMEIDA, A.S.D; SOUZA-SANTOS, R. Insalubrious touristic environments and schistosomiasis transmission in Pernambuco, Brazil. *Revista Ambiente & Água* 2018 13(3).
- BARRETO, M.S; GOMES, E.C.S.; BARBOSA, C.S. Turismo de risco em áreas vulneráveis para a transmissão da esquistossomose mansônica no Brasil. *Cad. Saúde Pública* 2016; 32(3).
- BRASIL, I.R.C; NEPOMUCENO, L.R; SHULLER, R.T; ESMERALDO, T.M; ESMERALDO, R.M; Esquistossomose hepático como achado ocasional de fígado de doador para transplante. *Medicina*, 46(2): 178-182, 2013.
- 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) / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 2. ed., Brasília, Ministério da Saúde, 2008c.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de vigilância epidemiológica**. (Série A. Normas e Manuais Técnicos). 7ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 816 p., 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema Nacional de Vigilância Em Saúde- *Relatório de Situação*. 5. ed. Brasília, 2011b.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica: diretrizes técnicas**. Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose (PCE) / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica – 2. ed. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2008.

CALASANS, T.A.S. OLIVEIRA, F.J. TELES, W.S. JERALDO, V.L.S. Avaliação Parasitária de moluscos *Biomphalaria glabrata* coletados na praia de Aruana, Aracaju/SE. In: Anais, I Simpósio Interdisciplinar Regional de Saúde e Ambiente, Aracaju, SE, 2013.

CAMARGO, E.A.F; BOAVENTURA, J.C.S. Características epidemiológicas da esquistossomose em Mogi Guaçu, São Paulo, Brasil. *Interciência Sociedade* 2014; 3(2): 27-32.

CAMPOS, R; DINIZ, F; REIS, J. Política ambiental e as faces do mercado imobiliário na RMR: apropriação da natureza, empreendedorismo e símbolos ambientais. *Revista Brasileira de Meio Ambiente* 2018; 2(1).

CARDIM, L.L; FERRAUDO, A.S; PACHECO, S.T.A; REIS, R.B; SILVA, M.M.N; CARNEIRO, D.D.M.T; BAVIA M.E. Análises espaciais na identificação das áreas de risco para a esquistossomose mansônica no Município de Lauro de Freitas, Bahia, Brasil. *Cad. Saúde Pública* 2011. 27 (5): 899-908.

CARVALHO, O.D.S; MENDONÇA, C.L.F.D; MARCELINO, J.M.D.R; PASSOS, L.K.J; FERNANDEZ, M.A; LEAL, R.D.S; CALDEIRA, R.L; SCHOLTE, R.G.C; CARMO, E.H; MESQUITA, S.G; THIENGO, S.C. Distribuição geográfica dos hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni* nos estados do Paraná, Minas Gerais, Bahia, Pernambuco e Rio Grande do Norte, 2012-2014. *Epidemiologia e Serviços de Saúde* 2018. 27, e2017343.

CARVALHO, O.S; COELHO, P.M.Z.; LENZI, H.L. *Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar*. Rio de Janeiro, Editora Fiocruz, 2008.

COELHO, M.C.N. *Impactos Ambientais em áreas urbanas – Teorias, Conceitos e Métodos de Pesquisa*. In. GUERRA, Antônio José Teixeira; CUNHA, Sandra Baptista da. (Org.) *Impactos Ambientais no Brasil*. Rio de Janeiro: Bertrand Brasil, 2013.

COIMBRA-JUNIOR, C.E.A; SANTOS, R.V; SMANIO-NETO, L. Potencial endêmico da esquistossomose para o Estado de Rondonia, Brasil. *Rev. Saúde Pública* 1984. 18: 510-15.

CONCEIÇÃO, M. M.; MELO, A. G. S.; BARROS, E. C. P.; MELO, C. M.; LAZARINI, H.; LIBOS, M. Water and epidemiological aspects of schistosomiasis transmission in tourist area of Alagoas. *Interfaces Interfaces Científicas - Saúde e Ambiente*. 2016; V.4, N.2 p. 35-42.

CORRÊA, R.S; SILVA, R.V.B. Ocupação urbana e degradação ambiental: ocupação, simbolismo e cidadania ambiental no bairro do Paraíso, Mosqueiro-PA. *Revista Perspectivas do Desenvolvimento* 2015; 3(4).

COURA, J.R; AMARAL, R.S.P. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. *Mem. do Instituto Oswaldo Cruz* 2004. 99(1): 13-19.

COURA-FILHO, P. Distribuição da esquistossomose no espaço urbano. 2. Aproximação teórica sobre a acumulação, concentração, centralização do capital e a produção de doenças. *Cad. Saúde Pública* 1997. 13(3): 415-424.

COURA-FILHO, P; ROCHA, R.S; LIMA, C.M.F.F; KATZ, N. A municipal level approach to the management of schistosomiasis control in Peri-Peri, MG – Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop* 1992; 34: 543-548.

COUTO, J.L.A. Esquistossomose mansoni em duas mesorregiões do Estado de Alagoas. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005. V. 38(4) p. 301-4.

CUNHA, L.A.D; GUEDES, S.A.G. Prevalência de esquistossomose mansônica na cidade de Nossa Senhora do Socorro, Sergipe, 2001-2006. *Ideias Inovação* 2012; 01(01): 41-48.

DE PAULA SILVA, J; RAMOS, S.B; DE ANDRADE, M. Análise multivariada da esquistossomose no estado de Minas Gerais: análise de componentes principais. *ABCS Health Sciences* 2018; 43(2).

DE SOUZA GOMES, E. C; LEAL-NETO, O. B; ALBUQUERQUE, J; PEREIRA DA SILVA, H; BARBOSA, C. S. "Schistosomiasis transmission and environmental change: a spatio-temporal analysis in Porto de Galinhas, Pernambuco--Brazil". *International journal of health geographics* 2012; 11:51-20.

DIAS, A.S; SOBREIRA, R.R; AGUIAR G.B; MELOTTI, V.D; ARAÚJO J.V; BRAGA, F.R; PUPPIN, A.C; PERBONI, W.R; BERTONCELI, R.M; SILVA, R.G; RAMOS, R.F. Estudo da distribuição de moluscos aquáticos no sul do Estado do Espírito Santo. *Acta Veterinaria Brasilica* 2013. 7(2):154 – 157.

DIAS, L.C.S; GLASSER, C.M; MARCAL, J.R.O; BONESSO, P.I.P. Epidemiologia da esquistossomose mansônica em área de baixa endemicidade. *Cad. Saúde Pública* 1994. 10(2): 254 -260.

ENK, M. J.; AMORIM, A.; SCHALL, V.T. Acute schistosomiasis outbreak in the metropolitan area of Belo Horizonte, Minas Gerais: alert about the risk of unnoticed transmission increased by growing rural tourism. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; 98:745-50.

ENK, M. J.; CALDEIRA, R. L.; CARVALHO, O.S.; SCHALL, V.T. Rural tourism as risk factor for the transmission of schistosomiasis in Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 105-8.

ENK, M.J; AMARAL, G.L; SILVA, M.F.C; SILVEIRA-LEMOS, D; TEIXEIRA-CARVALHO, A; MARTINS-FILHO, O.A. Rural tourism: a risk factor for schistosomiasis transmission in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2010; 105:537-40.

FERNANDES, D.A; CHAGAS, A.C.P; JESUS, A.R; VIANEY, A; FRANÇA, C; LIMA, F.S; SILVA, A.M; GODINHO, A.S; FRANCO, K.G.S. Sonographic Features Associated With Morbidity Of Chronic Clinical Presentations Of Schistosomiasis Mansonii Using The Protocol Proposed By The World Health Organization. *Radiologia Bras* 2013. 46(1): 1–6.

FRANDSEN, F. Discussion of the Relationships Between Schistosoma and their Intermediate Hosts, Assessment of the Degree of Host-parasite Compatibility and Evaluation of Schistosome Taxonomy. *Z. Parasitenkd* 1979, vol.58, 275-296.

FREZZA, T.F; MADI, R.R; BANIN, T.M; PINTO, M.C; SOUZA, A.L.R; GREMIÃO, M.P.D; ALLEGRETTI, S.M. Efeito do praziquantel incorporado a lipossomas nos diferentes estágios de desenvolvimento dos ovos de *Schistosoma mansoni*. *Rev. Ciênc Farmacêuticas Básica e Aplicada* 2007, 28(2): 209- 214.

GARBOIS, J.A; VARGAS, L.A; CUNHA, F.T.S. O direito à saúde na Estratégia Saúde da Família: uma reflexão necessária. *Physis: Rev. Saude Coletiva* 2008; 18(1): 27-44.

GIOVANELLI, A. SOARES, M. S. D'ANDRÉA, P. S. GONÇALVES, M. M. L. REY, L. (Abundância e infecção do molusco *Biomphalaria glabrata* pelo *Schistosoma mansoni* no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Rev. Saúde Pública* 2001. v. 35, p. 523-530.

GOMES, E.C.S. *Modelo de Risco Para Esquistossomose: Abordagem Espaço-Temporal Da Transmissão No Litoral De Pernambuco*. [Dissertação - Doutorado em Ciências]. Recife: Fundação Oswaldo Cruz; 2011.

GOMES, E.C.S; LEAL-NETO, O.B; ALBUQUERQUE, J; SILVA, H.P; BARBOSA, C.S. Schistosomiasis transmission and environmental change: a spatio-temporal analysis in Porto de Galinhas, Pernambuco – Brazil. *Int J Healyh Geograph* 2012. 11: 51.

GRAY, D; MCMANUS, D.P; LI, Y; WILLIAMS, G.M; BERGQUIST, R; ROSS, A.G. Schistosomiasis elimination: lessons from the past guide the future. *The Lancet Infectious Diseases* 2010; 10: 733-736.

GRENFELL, R; MARTINS, W; MORAES, V.S; ARAUJO, N; OLIVEIRA, E; FONSECA, C; COELHO, P.M.Z. The schistosomula tegument antigen as a potential candidate for the early serological diagnosis of *schistosomiasis mansoni*. *Rev. Inst. Med. Trop.* 2013. 55(2):75-78.

GRIMES, J. ET.; CROLL, D.; HARRISON, W.E.; UTZINGER, J.; FREEMAN, M.C.; TEMPLETON, M.R. The roles of water, sanitation and hygiene in reducing schistosomiasis: a review. *Parasites & Vectors*. 2015; 8:156
DOI 10.1186/s13071-015-0766-9

GRYSEELS, B. Schistosomiasis. *Infectious Diseases Clin North America* 2012; 26: 383-397.

GRYSEELS, B; POLMAN, K; CLERINX, J; KESTENS, L. Human schistosomiasis. *The Lancet* 2006. 368:1106- 1118.

HATZ, C.F.R. Schistosomiasis: An Underestimated Problem in Industrialized Countries? *J. Travel Med.* 2005. 12(1): 1-2.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística Aglomerados Subnormais Primeiros Resultados. Brasil Censo demográfico 2018; p 1-259.

JESUS, A. R; SILVA, A; SANTANA, L.B; MAGALHÃES, A; JESUS, A.A; ALMEIDA, R. P. Clinical and immunologic evaluation of 31 patients with acute schistosomiasis mansoni. *J Infect Dis* 2002; 185:98-105.

KATZ, N.; CHAVES, A.; PELLEGRINO, J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in Schistosomiasis mansoni. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1992; 14(6): 397-400.

KATZ, N. Dificuldades no desenvolvimento de uma vacina para a esquistossomose mansoni. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop* 1999. 32 (6).

KATZ, N; ALMEIDA, K. Esquistossomose, Xistosa, Barriga D'água. *Rev. Ciênc Cult* 2003; 55(1) 38-43.

KATZ, N; PEIXOTO, S. V. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil. *Rev. Soc. Bras Med. Trop* 2000, 33(3): 303-308.

KATZ, N; SANTOS-FILHO, D; SARTI, S.J; MENDES, N.M; ROCHA-FILHO, P.A; ARAUJO, N. Atividade quimioprofilática na esquistossomose mansoni de sabonetes contendo óleo essencial de frutos de *Pterodonpubescens*. *Rev. Inst. Med. Trop* 1993. 2: 183-191.

LEAL-NETO, O. B; GOMES, E. C. S; JUNIOR, F. J. M. O; ANDRADE, R.; SANTOS, R. S; BOCANEGRA, S; BARBOSA, C. S. Biological and environmental factors associated with risk of schistosomiasis mansoni transmission in Porto de Galinhas, Pernambuco State, Brazil. *Cad. Saúde Pública* 2013. 29(2): 357-367.

LEAL-NETO, O.B; GALVÃO, T.Y.C; ESTEVES, F.A M; GOMES, A M.A.S; GOMES, E.C.S; ARAÚJO, K.C.G.M; BARBOSA, C.S. Análise espacial dos casos humanos de esquistossomose em uma comunidade horticultora da Zona da Mata de Pernambuco, Brasil. *Rev. Bras Epidemiol* 2012;15(4): 771-80.

LEYTON, V; HENDERSON, T.O; MASCARA, D; KAWAN, T. Atividade moluscicida de princípios ativos de folhas de *Lycopersicon esculentum* (Solanales, Solanaceae) em *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda, Planorbidae). *Iheringia. Série Zoologia* 2005. 95(2): 213-216.

LIE, K. J., HEYNEMAN, D; RICHARDS, C. S. Studies on resistance in snails: Interference by nonirradiated echinostome larvae with natural resistance to Schistosomamansoni in *Biomphalaria glabrata*. *J. Invertebrate Pathol* 1977. 29(2), 118–125. doi:10.1016/0022-2011(77)90183-5

LIMA, V.L.C. Urban Schistosomiasis and Social and Epidemiological Heterogeneity in Campinas, São Paulo, Brazil. *Cad. Saúde Pública* 1995. 11(1): 45-56.

LIRA, M.G.S; MIRANDA, G.S; RODRIGUES, J.G.M; NOGUEIRA, R.A; GOMES, G.C.C; SILVA-SOUZA, N. Ocorrência de *Schistosoma mansoni* no município de São Bento, Baixada Ocidental Maranhense, estado do Maranhão, Brasil. *Revista Pan-Amazônica de Saúde* 2017; 8(4): 45-51.

MACHADO-SILVA, J. R; PELAJO-MACHADO, M; LENZI, H. L; GOMES, D. C. Morphological study of adult male worms of *Schistosomamansoni* Sambon, 1907 by confocal laser scanning microscopy, Rio de Janeiro, Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1998. v. 93, supl. 1, p. 303-307.

MASSARA, C.L; AMARAL, G.L; CALDEIRA, R.L; DRUMMOND, S.C; ENK, M.J; CARVALHO, O.S. Schistosomiasis in an ecotourism area in Minas Gerais State, Brazil. *Cad. Saúde Pública* 2008. 24(7):1709-1712.

MASSARA, C.L; ENK, M.J; CALDEIRA, R.L; MENDONÇA, C.L.F; SCHOLTE, R.G.C; CARVALHO, O.S. Ocorrência de moluscos do gênero *Biomphalaria* em parques da cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. *Rev. Patologia Trop* 2012. 41(4): 471-479.

MATOS, V; BARCELLOS C. Relações entre turismo e saúde: abordagens metodológicas e propostas de ação. *Rev. Panam Salud Publica*. 2010; 28(2):128–34.

MELO, A.G.S; MELO, C.M; OLIVEIRA, C.C.C; OLIVEIRA, D.S; SANTOS, V.B; JERALDO, V.L.S. Esquistossomose em área de transição rural-urbana: reflexões epidemiológicas. *Ciênc Cuidado Saúde* 2011. 10(3): 506-513.

METSALU T; VILO J. ClustVis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap. *Nucleic Acids Research*. 2015; 43 (1): 566-570.

NEVES, D. P. *Parasitologia Básica*. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

NEVES, R.H; MACHADO-SILVA, J.R; PELAJO-MACHADO, M; OLIVEIRA, S.A; COUTINHO, E.M; LENZI, H.L; GOMES, D.C. Morphological aspects of *Schistosoma mansoni* adult worms isolated from nourished and undernourished mice: a comparative analysis by confocal laser scanning microscopy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2001. 96(7), 1013-1016.

NOYA, B.A; RUIZ-GUEVAR, R; COLMENARES, C; LOSADA, S; NOYA, O. Low transmission areas of schistosomiasis in Venezuela: consequences on the diagnosis, treatment, and control. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2006.101(29):29-35.

OLIVEIRA, D.S.O.S; CALASANS, T.A.S; MELO, A.G.S; MELO, C.M; MADI, R.R; JERALDO, V.L.S. Reflex of urban space changes and climate conditions in *Biomphalaria glabrata* population dynamics on potential schistosomiasis foci in northeastern Brazil. *Scientia Plena* 2016, v. 12, n. 8.

OLIVEIRA, D.S; SANTOS V.B; MELO A.G; LIMA A.S; CARVALHO, C.D; ALLEGRETTI, S.M; MELO, C.M; MADI, R.R; JERALDO, V.L.S. Schistosomiasis mansoni in urban northeast Brazil: influence of rainfall regime on the population dynamics of *Biomphalaria* sp.. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop* 2013. 46(5): 654-657.

OLIVEIRA, S.A; BARBOSA JR, A.A; GOMES, D.C; MACHADO-SILVA, J.R; BARROS, A.F; NEVES, R.H; COUTINHO, E.M. Morphometric study of *Schistosoma mansoni* adult worms recovered from undernourished infected mice, Rio de Janeiro, Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003. 98(5), 623-627.

OLIVEIRA, T.F; SOARES, M.S; CUNHA, R.A; JONATHAN, S.S. Educação e controle da esquistossomose em Sumidouro (RJ, Brasil): avaliação de um jogo no contexto escolar. *Rev. Bras. Pesquisa Educ Ciênc*, 2008; 8(3): 1-18.

PALIALOL, B.T. Evidências Empíricas dos Impactos do Saneamento Sobre aSaúde. Temas de economia aplicada. *Informações Fipe* 2014. 40-46.

PALMEIRA, D.C.C; CARVALHO, A.G; RODRIGUES, K; COUTO, J.L.A. Prevalência da infecção pelo *Schistosoma mansoni* em dois municípios do Estado de Alagoas.*Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2010. 43(3): 313-317.

PARAENSE, W. L.; CORREA, L. R. Variation in susceptibility of populations of *Australorbis glabratus* to a strain of *Schistosoma mansoni*. *Rev. Inst. Med. trop.*1963; 5(1):15-22.

PARAENSE, W.L. Distribuição dos caramujos no Brasil. In: Reis, F.A, Faria, I, Katz, N. organizadores. Modernos Conhecimentos sobre Esquistossomose Mansônica. Belo Horizonte: *Acad. Mineira Med.* 1986. v. 1, p.117-128.

PARAENSE, W.L. Fauna planorbídica do Brasil. In: LACAZ, C. S.; BARUZZI, G. R.; SIQUEIRA, J.R. W. Introdução à geografia médica do Brasil, Ed. Universidade de São Paulo. *Introdução Geogr Méd Brasil* 1972. p. 213-239.

PARAENSE, W.L. Histórico do Gênero *Biomphalaria*, Morfologia e Sistemática Morfológica. In: CARVALHO, O.S; COELHO P.M.Z; LENZI, H.L. *Schistosoma mansoni* esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro, Brasil.Fiocruz 2008. p. 285-308.

PARAENSE, W.L.; CORREA, L.R. Variation in susceptibility of populations of *Australorbis glabratus* to a strain of *Schistosoma mansoni*, São Paulo, Brasil. *Rev. Inst. Med. Trop* 1963. v. 5. n. 1. p. 15-22.

PARISE-FILHO, R; SOUZA, T.M; ARAÚJO, M.B; FERNANDES, N.A.; SILVEIRA, A.M.B. Análise químico-farmacêutica da oxamniquina e de suas especialidades farmacêuticas. *Rev. Bras. Ciênc Farmacêuticas* 2001. 37(1): 61-72.

PEPE, M.S; CALDEIRA, R.L; CARVALHO, O.S.I; MULLER, G; PASSOS, L.K.J; RODRIGUES, A.P; AMARAL, H.L. *Biomphalaria* mollusks (Gastropoda: Planorbidae) in Rio Grande do Sul, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2009; 104(5): 783-786.

PIERI, O.S; JURBERG, P. Aspectos Etiológicos na Sobrevivência dos Caramujos Vetores da Xistosomose ao Tratamento com Moluscidas. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1991. 76(1): 47-55.

PINHEIRO, L; CORTEZ, D.A.G; VIDOTTI, G.J; YOUNG, M.C.M.; FERREIRA, A.G. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade moluscicida da *Kielmeyera variabilis* Mart (CLUSIACEAE). *Química Nova* 2003. 26(2): 157-160.

PNUD. *Informe Regional sobre Desarrollo Humano para América Latina y el Caribe*, 2010.

RAPPSILBER, J.; MANN, M.; ISHIHAMA, Y. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nat Protoc.* 2007; 2(8):1896-906.

RIBEIRO, H; VARGAS, H.C. Urbanização, globalização e saúde. *Revista USP* 2015; 107: 13-26.

RICE, Marnie E.; HARRIS, Grant T. Comparing effect sizes in follow-up studies: ROC Area, Cohen's d, and r. *Law and human behavior*, v. 29, n. 5, p. 615, 2005.

ROCHA, R.S; SILVA, J.G; PEIXOTO S.V; CALDEIRA, R.L; FIRMO, J.O.A; CARVALHO, O.S; KATZ, N. Avaliação da esquistossomose e de outras parasitoses intestinais, em escolares do município de Bambuí, Minas Gerais, Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop* 2000; 33(5): 431-436.

ROCHA, T.J.M; FILHO, B.P.N; NOÉ, B.D.R; JÚNIOR, C.P.V; COSTA, G.N; ARAGÃO, M.B; SANTOS, A.F. Estudo do Efeito Moluscicida de Espécies Vegetais em Embriões e Caramujos Adultos de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Gastropoda, Planorbidae). *Rev. Pat. Trop* 2013. 42(2): 230.

ROCHA, T.J.M; SANTOS, M.C.S; LIMA, M.V.M; CALHEIROS, C.M.L; WANDERLEY, F.S. Aspectos epidemiológicos e distribuição dos casos de infecção pelo *Schistosoma mansoni* em municípios do Estado de Alagoas, Brasil. *Rev. Pan-Amaz Saude* 2016. v. 2, n. 7, p. 27-32.

ROLLEMBERG, C.V.V; SANTOS, C.M.B; SILVA, M.M.B.L; SOUZA, A.M.B; SILVA, Â.M; ALMEIDA, J.A.P; AMEIDA, R.P; JESUS, A.R. Aspectos epidemiológicos e distribuição geográfica da esquistossomose e geo-helminths, no Estado de Sergipe, de acordo com os dados do Programa de Controle da Esquistossomose. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop* 2011. 44(1): 91-96.

SANTOS, A.N; MELO, A.C.F.L. Prevalência da esquistossomose num povoado do Município de Tutóia, Estado do Maranhão. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop* 2011. 44(1): 97-99.

SARVEL, A.K; OLIVEIRA, A.A.; SILVA, A.R; LIMA, A.C.L; KATZ, N. Evaluation of a 25-Year-Program for the Control of Schistosomiasis *Mansoni* in an endemic Area in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 2011. 5: e990.

SCHOLTE, R. G.; CARVALHO, O. S.; MALONE, J. B.; UTZINGER, J.; VOUNATSOU, P. Spatial distribution of *Biomphalaria* spp., the intermediate host snails of *Schistosoma mansoni*, in Brazil. *Geospatial Health* 2012, v. 6, n. 3, p. S95-S101, 1 set.

SEVILLA, M.A.A. *Ecologia do Gênero Biomphalariae Estrutura Genética das Populações de Schistosoma mansoni do Estado de Pernambuco Recife*. [Dissertação-Doutorado em Saúde Pública do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães]. Recife-Brasil Fundação Oswaldo Cruz, 2010.

SILVA, K.E.R; SILVA, R.M.F; COSTA, S.P.M; ROLIM, L.A; LIMA, M.C.A; ROLIM-NETO, P.J. Alternativas terapêuticas no combate à Esquistossomose Mansônica. *Rev. Ciênc Farmaceuticas Básica Aplicadas* 2012. 33(1): 9-16.

SILVA, N.F.S; COGO, J; WIEPIESKI, C.C.P; LAVERDE-JÚNIOR, A. Bioensaio de Atividade Moluscicida Adaptado Para A Avaliação de Extratos De Plantas Medicinais. *Arquivos Ciênc Veterinárias Zoológicas Unipar* 2008.11(2): 179-181.

SILVA, P.B; BARBOSA, C.S; PIERI, O; TRAVASSOS, A; FLORENCIO, L. Aspectos físico-químicos e biológicos relacionados à ocorrência de *Biomphalaria glabrata* em

focos litorâneos da esquistossomose em Pernambuco. *Química Nova* 2006; 29(5): 901-906.

SILVA, P.C.V; DOMINGUES, A.L.C. Aspectos epidemiológicos da esquistossomose hepatoesplênica no Estado de Pernambuco, Brasil. *Epidemiologia Serviços Saúde* 2011. 20(3): 327-336.

SILVEIRA, A.C. Controle da Esquistossomose no Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1989. 84: 91.

SILVEIRA, R. D; SARTORI, M. G. B. Elementos Geocológicos e Geourbanos de São Sepé-Rs, Brasil: Condicionantes Para Estudo Do Clima Urbano. *Rev. Geogr América Central Número Especial EGAL* 2011. 1-13.

SOUZA, A. A; BARBOSA, V. S; WANDERLEI, T. N. G; BARBOSA, C. S. Criadouros de *Biomphalaria*, temporários e permanentes, em Jaboatão dos Guararapes, PE. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop* 2008. 41(3): 252-256.

SOUZA, C.P; LIMA, L.C. Moluscos de Interesse Parasitológico do Brasil. Centro de Pesquisa "René Rachou" V Fiocruz, Belo Horizonte, 1ª Ed., 76p. 1990.

SOUZA, F.P.C; VITORINO, R.R; COSTA, A.P; FARIA F.C; SANTANA, L.A; GOMES, J.A. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. *Rev. Bras. Clin Med* 2011. 9(4): 300-307.

SOUZA, J.A.R; MOREIRA, D.A; CONDÉ, N.M; CARVALHO, W.B; CARVALHO, C.V.M. Análise das condições de potabilidade das águas de surgências em Ubá, MG. *Rev. Ambiente Água* 2015. 10(3): p. 614-622.

SOUZA, M.A.A; BARBOSA, V.S; ALBUQUERQUE, J.O; BOCANEGRA, S; SANTOS, R.S; PAREDES, H; BARBOSA, C.S. Aspectos Ecológicos e Levantamento Malacológico para Identificação de áreas de Risco para Transmissão da Esquistossomose Mansonii no Litoral Norte De Pernambuco, Brasil. *Iheringia Série Zoologia* 2010. 100(1): 19-24.

TEIXEIRA, R. S; LIMA, E.G; SANTANA, J.V; CRUZ, C. F; ALCÂNTARA, S. R. S; Schwarzelmüller, H. Espacialização do Caramujo Da Espécie *Biomphalaria glabrata* do Córrego da Lagoa do Parque de Pituaçu Salvador – Ba. Candombá – Rev. Virtual 2011. 7, (1): 55-64.

TIBIRIÇA, S.H.C. *Epidemiologia da esquistossomose em três municípios da microrregião de Juiz de Fora, Minas Gerais*. [Dissertação – Doutorado]. Juiz de Fora: Universidade Federal de Juiz de Fora -MG – Brasil; 2008.

TIBIRIÇA, S.H.C; GUIMARÃES, F.B.; TEIXEIRA, M.T. *Schistosoma mansoni* in the context of the Brazilian health policy. *Ciênc Saúde Coletiva* 2011; 16(1): 1375-1381.

TOMÉ, C. M; CIPOLLI, E; COELHO DA SILVA, C.L.P.A; BORGES, D.A; SOARES, M. S. *Esquistossomose na estância turística de Holambra (SP, Brasil)*. In: Anais do 9º Simpósio Internacional sobre Esquistossomose. Belo Horizonte: Programa Integrado de Esquistossomose, Fundação Oswaldo Cruz; p.68, 2003.

TUAN, R. Distribuição e diversidade de espécies do gênero *Biomphalaria* em Microrregiões Localizadas no Médio Paranapanema. *Biota Netropical* 2009, 9(1): 279-276.

UNAL, I. Defining an Optimal Cut-Point Value in ROC Analysis: An Alternative Approach. *Computational and mathematical methods in medicine*, v. 2017, 2017.

VIDAL, L.M; BARBOSA, A.S; RIBEIRO, R.M.C; SILVA, L.W.S; VILELA, A.B.A; PRADO, F.O. Considerações sobre esquistossomose mansônica no município de Jequié, Bahia. *Rev. Patologia Trop* 2011; 40 (4): 367-382.

VITORINO, R.R; SOUZA, F.P.C; COSTA, A.P; FARIA-JÚNIOR, F.C; SANTANA, L.A; GOMES, A.P. Esquistossomose mansônica: diagnóstico, tratamento, epidemiologia, profilaxia e controle. *Rev. Bras. Clín. Méd.* 2012. 10(1): 39-45.

VRANJAC, A. *Vigilância Epidemiológica e Controle da Esquistossomose- Normas e Instruções*. Centro De Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac", São Paulo, 2007.

WALDMAN, T.C. Movimentos migratórios sob a perspectiva do direito à saúde: imigrantes bolivianas em São Paulo. *Rev. Direito Sanitário* 2011; 12(1): 90-114.

WHO. Organización Mundial de la Salud, 2013. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/index.html>. Acesso em: 14 setembro 2015.

ZHANG, Y.; MACARTHUR,C.; MUBILA, L.; BAKE, S. Control of neglected tropical diseases needs a long-term commitment. *BioMed Center Med* 2010; 8: 6

6 CAPITULO III – ARTIGO 1

Aspectos ambientais e biológicos associados à ocorrência de *Biomphalaria glabrata* em dois ambientes diferentes em área litorânea no nordeste do Brasil

Taíssa Alice Soledade Calasans^{1,2}, Verónica de Lourdes Sierpe Jeraldo^{1,2}

Resumo

Introdução: Os moluscos *Biomphalaria glabrata* são hospedeiros intermediários do agente etiológico da esquistossomose, *Schistosoma mansoni*, responsável por infectar milhares de pessoas no Brasil e no mundo. Esse molusco pode representar uma ameaça quando encontrado em coleções hídricas que ocorre o contato humano. A compreensão dos fatores ambientais que propiciam a sua instalação no ambiente é crucial para avaliar o seu potencial de sobrevivência e transmissão. O presente estudo testou a resistência de *B. glabrata* a gradientes de salinidade e avaliou os parâmetros físico-químicos no ambiente hídrico litorâneo e rural do estado de Sergipe. **Métodos:** Realizada uma avaliação malacológica e ambiental em área litorânea e rural, nos quais foram feitas análises parasitológicas em *B. glabrata* para investigar a infecção por *S. mansoni*, e análises físico-químicas da água e sedimento dos criadouros, bem como análises microbiológicas da água. Foi realizado um experimento com os moluscos para se testar a sua tolerância a concentrações de salinidade. **Resultados:** De 6.423 moluscos coletados, 2.002 (98,5%) não estavam infectados, com 30 (1,5%) infectados da praia, e na área rural, 4.236 moluscos não infectados e 155 (3,5%) infectados. As variáveis ambientais e físico-química da água e sedimento quando comparadas entre os pontos de coleta no período de seca, apresentaram valores maiores na praia como, por exemplo, a Precipitação (30,3 mm), Temperatura (28,9 °C), Turbidez (15,6 NTU), pH (7,2) e Manganês (24,2). Estes parâmetros também se encontravam maiores no período chuvoso e no grupo de moluscos infectados. Análises microbiológicas revelaram a positividade de *E. coli* na água, dentro do período climático seco e chuvoso. O teste de salinidade revelou que os moluscos coletados na praia, permaneceram vivos, quando expostos às diluições de 25 e 30% e 40 a 95%, no entanto, os moluscos da rural se encontravam vivos em todas as diluições, exceto de 5%. **Conclusão:** O estudo revelou a presença da espécie *B. glabrata* eliminando cercarias de *S. mansoni*, bem como sua resistência e sobrevivência a fatores físico-químicos com valores variados no ambiente litorâneo comparado ao ambiente rural. O que pode gerar a formação/manutenção de focos de transmissão da esquistossomose na área.

Palavras-chave: esquistossomose, *Biomphalaria glabrata*, fatores ambientais, coleção hídrica.

Introdução

Os moluscos aquáticos da espécie *Biomphalaria glabrata* são hospedeiros intermediários do helminto *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907) [1], responsável pela esquistossomose mansônica que afeta mais de 200 milhões de pessoas no mundo [2-3].

A infecção humana acontece devido à presença de moluscos infectados que liberam cercarias do *S. mansoni* em ambientes hídricos [4]. A espécie *B. glabrata* é considerada de ampla distribuição geográfica nos territórios brasileiros, o que a torna uma das espécies mais importante no ciclo de transmissão da esquistossomose mansônica em diversas regiões [5]. Estes moluscos colonizam uma diversidade de ambientes lóticos e lênticos de comunidades urbanas e rurais, e podem se tornar um risco à saúde humana quando há insuficiência no saneamento básico dos ambientes [6].

Os habitats hídricos nos quais são encontrados moluscos *B. glabrata* podem ser de caráter permanente ou temporário, desde rios, lagoas, valas e até poças de água pluvial [7]. Estes habitats são formados por coleções hídricas dulcícolas e sedimentos, dotados de parâmetros físico-químicos (pH, salinidade, temperatura e oxigênio dissolvido) adequados à sobrevivência e reprodução destes moluscos [8]. Entretanto, na área litorânea do estado de Pernambuco/Brasil, foram encontradas populações de *B. glabrata* vivendo em ambientes com média de salinidade 15 vezes maior que o máximo aceito para água doce, o que segundo os autores representa uma nova condição físico-química de sobrevivência da espécie, uma vez que são consideradas típicas de água doce [8].

Outro fator importante é a habilidade da espécie de se enterrar em solo úmido para se proteger de condições adversas como dessecação e aplicação de moluscicidas [9]. Bem como, utilizar durante a alimentação pequenas partículas de areia de alguns substratos para facilitar a trituração de alimentos [10]. Suportando também solo com teor de salinidade que pode ser superior ao solo de água doce, que segundo Silva e Adorno [11] é produto da ação das ondas do mar que podem interferir no solo, causando variação na retenção de água e assim afetar os organismos em seus processos reprodutivos ou no seu desenvolvimento, levando-os a adaptações fisiológicas.

A Zona Litorânea dos estados que compõem a região nordeste do Brasil tem sofrido uma grande transformação urbanística, tanto pelo turismo quanto pela expansão imobiliária. A urbanização das zonas próximas às praias tem gerado problemas estruturais e ambientais, tais como instalações inadequadas de tubulações que provocam

o acúmulo de água na faixa de areia. Estes locais podem servir de criadouros para moluscos demonstrando potencialidade como área de risco de transmissão da esquistossomose. Isto é possível, visto que estes animais têm demonstrado alta capacidade adaptativa em condições adversas [12].

A espécie *B. glabrata* já foi notificada em 806 municípios de 16 estados brasileiros e no Distrito Federal; na região nordeste do país a espécie é encontrada na faixa litorânea dos estados de Alagoas, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte e Sergipe [13]. O relato de moluscos encontrados em novos habitats de zona litorânea gera uma preocupação por se tratar de um ambiente de alto apelo turístico e imobiliária. Dentro desta perspectiva, é imprescindível o entendimento dos fatores ambientais que permitem a sobrevivência dos moluscos e a sua possível infecção por *S. mansoni*, a fim de identificar possíveis novas áreas de manutenção de *B. glabrata* e de transmissão da esquistossomose.

O estudo do ambiente colonizado por moluscos de importância médica com base em parâmetros ambientais é relevante para relacionar à sobrevivência da espécie *B. glabrata* e compreender sua presença em região litorânea. Assim, o objetivo do presente estudo foi testar a resistência de *B. glabrata* a gradientes de salinidade e avaliar os parâmetros físico-químicos no ambiente hídrico litorâneo e rural no estado de Sergipe.

Métodos

Área de Estudo

O estudo foi realizado no município de Aracaju no estado de Sergipe que compreende uma população estimada 650.106 habitantes, com uma densidade demográfica de 3.140,65 habitantes/km², 55,4% de vias públicas urbanizadas, 87,2% de domicílios com esgotamento sanitário adequado e 56,6% de domicílios urbanos. Foram investigados dois locais (criadouros) de moluscos, um na zona litorânea, denominado de Praia, localizado no bairro da Aruanda na cidade de Aracaju, capital do estado de Sergipe, e um segundo ponto denominado de Rural, este localizado no município de São Cristóvão (fig 1), região metropolitana de Aracaju a 26 km da capital [14].

O mapeamento georeferencial das áreas foi realizado utilizando um receptor GPS (Garmin, modelo Vista Cx) para marcação dos pontos: Praia (S11° 01.193' W037° 04.291') e Rural (S11° 00.170' W037° 12.648') configurado no sistema de projeção geográfica SIRGAS 2000 UTM. Os pontos foram selecionados aleatoriamente com base na ocorrência de *Biomphalaria* spp., no perímetro urbano e rural dos municípios.

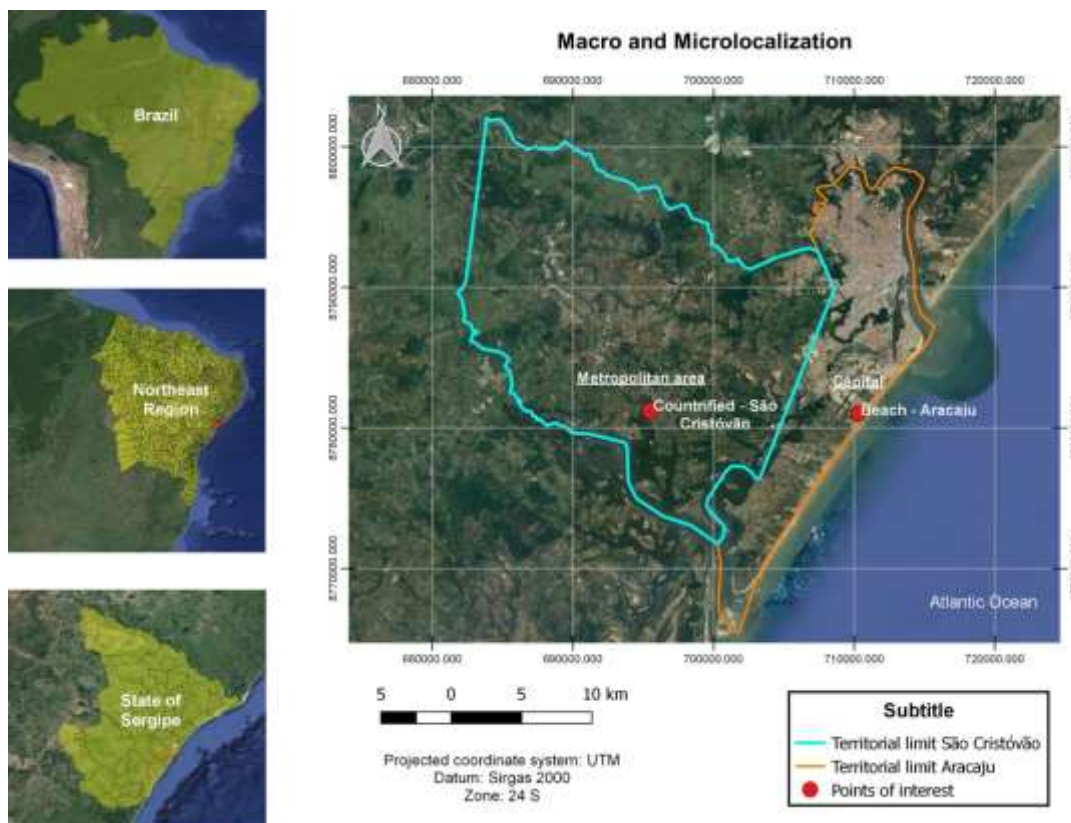


Figura 1. Pontos de coletas de *B. glabrata* em zona litorânea, próximo à maré na Praia de Aruanda (Aracaju-Se) e criadouro em ambiente rural de São Cristóvão. Software Quantum GIS (QGIS) 1.7.4.

Coleta e análise parasitológica dos moluscos

Mensalmente, no período de junho de 2015 a julho de 2017, os moluscos foram coletados com o tempo esforço de 2 horas/homem com o auxílio de peneiras e pinças, e em seguida acondicionados em recipientes plásticos identificados com data e local. Posteriormente, os moluscos foram colocados em aquários e alimentados com folhas de alface, quantificados e medido o diâmetro da concha, com auxílio de paquímetro digital (Messen 150 mm ISO9001: 2000). Uma amostra de quatro moluscos de cada ponto de coleta foi escolhida aleatoriamente para identificação específica da espécie, por meio da técnica de dissecação do aparelho genital [10].

Para avaliação da possível infecção por *S. mansoni* foi considerado positivo o molusco que estava eliminando cercárias do parasito. Para realização dessa análise, os moluscos foram isolados em frascos de vidro transparente com 4 ml de água deionada e filtrada, e expostos à luz de lâmpadas incandescentes (60W) a uma distância de 30 cm, durante 4 horas. Tal procedimento forneceu uma temperatura entre 28 e 30°C, capaz de estimular a emissão cercariana [13]. A taxa de infecção natural (TIN) foi determinada

através da fórmula: $TIN = N^{\circ} \text{ de moluscos parasitados} / N^{\circ} \text{ de moluscos coletados} \times 100$.

Levantamento das variáveis ambientais

Dados pluviométricos

Os dados pluviométricos foram obtidos na Secretaria de Recursos Hídricos do Estado de Sergipe (SRH-SE).

Análise físico-química e microbiológica da água

Para avaliação físico-química da água dos criadouros de moluscos, foram analisados *in situ* os seguintes parâmetros: temperatura, salinidade, sólidos totais dissolvidos e condutividade elétrica, utilizando uma sonda multiparâmetros HANNA HI 9828. Essa análise ocorreu mensalmente durante todo período de coleta.

Para a análise microbiológica foi utilizada a metodologia de Substrato Cromogênico/Enzimático SMEWW, 22^a Ed. 9223 B que usa substrato constituído de sais, fontes de carbono e nitrogênio, indicadores e nutrientes específicos para a detecção simultânea de coliformes totais e termotolerantes. As amostras positivas para coliformes foram detectadas visualmente por desenvolvimento de cor amarela no meio de cultura, sendo a presença de *Escherichia coli* (coliformes termotolerantes) detectada pela observação de fluorescência sob a luz UV [15]. Para cada análise foram coletados 100 mL de água dos criadouros, acondicionadas em caixas térmicas e mantidas resfriadas a 4°C até o momento das análises [16]. As coletas de água para os testes microbiológicos ocorreram trimestralmente, abrangendo os períodos de estiagem e de chuva.

Análise do sedimento

Os sedimentos foram coletados trimestralmente em vários pontos das margens dos criadouros, com ajuda de espátula de aço inoxidável e armazenados em sacos plásticos. Posteriormente as amostras foram homogeneizadas e secas em estufa a 100°C por 24h, e finamente pulverizadas (≈ 200 mesh) com um almofariz e pistilo de ágata. As análises foram realizadas de acordo com Silva (1999) [17].

Teste de Gradiente de Salinidade

Para testar o efeito da gradiente de salinidade sobre a sobrevivência dos moluscos, foi realizado um experimento esquematizado na Figura 2. Todas as amostras de água para este experimento foram autoclavadas para diminuir o possível efeito de agentes microbiológicos, sem alterar o efeito químico da salinidade. Os ensaios foram efetuados em triplicata, utilizando 10 moluscos para cada teste, e se iniciaram com a medida da variação da salinidade entre a água do mar e a menor salinidade encontrada em água doce. Foram realizadas diluições (a cada 5%) da água do mar até atingir 100% de diluição, para o grupo controle foi utilizada água do próprio local de coleta dos moluscos. Os testes foram realizados separadamente com moluscos coletados na praia e na área rural seguindo o mesmo protocolo.

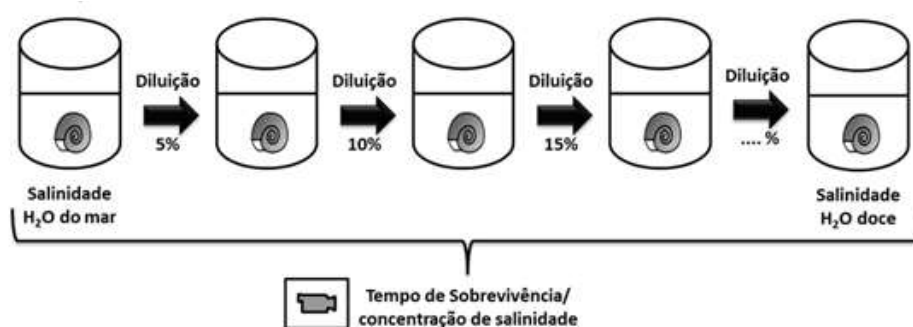


Figura 2. Teste da influência do gradiente de salinidade em moluscos *Biomphalaria glabrata*, coletados na praia no município de Aracaju e na área rural no município de São Cristóvão, Sergipe/Brasil.

Cada grupo de molusco foi submetido a uma serie experimental e a sobrevivência foi monitorada em 1h, 3h, 6h, 12h e 24h após o inicio do experimento. Após 24 horas todos os moluscos, inclusive aqueles considerados mortos foram colocados em água declorada para confirmação da mortalidade.

Análise estatística

As variáveis categóricas foram escritas por meio de frequência absoluta e relativa percentual. As associações entre variáveis categóricas foram testadas por meio do teste qui-quadrado. As variáveis contínuas foram descritas por meio de média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo. Diferenças de média foram avaliadas por meio de teste T e teste de Mann-Whitney. Tamanhos de efeito de Cohen foram calculados para determinar a magnitude das diferenças [18]. O experimento foi

analisado utilizando um modelo linear geral. Foram calculados R^2 e R^2 ajustado para avaliar adequação do estudo. Foram propostos pontos de corte letais para diluição, que foram avaliados por curva ROC e área abaixo da curva (AUC). Os critérios de seleção dos pontos foram o Índice de Youden (J), Proximidade do ponto (0,1) (ER), Índice de União (IU) e Probabilidade de Concordância (CZ) [19]. O nível de significância adotado foi de 5% e o software utilizado foi o R CORE Team 2018.

Resultados

Infecção dos moluscos

Foram coletados um total de 6.423 moluscos coletados da espécie *B. glabrata*, 2.032 no ponto praia e 4.391 no ponto rural. A tabela 1 mostra a distribuição de total de moluscos infectados e não infectados e de acordo com as estações seca e chuvosa. Foram detectados moluscos infectados na praia apenas no período chuvoso, diferente dos moluscos do ambiente rural que estavam infectados em ambos os períodos climatológicos ($p < 0.001$).

Tabela 1 Distribuição de moluscos *Biomphalaria glabrata* infectados e não infectados coletados na estação seca e chuvosa em criadouros em área de praia e rural. Estado de Sergipe/Brasil.

	Praia N (%)	Rural N (%)	p*
Total			
Infectado	30 (1,5)	155 (3,5)	<0,001
Não Infectado	2002 (98,5)	4236 (96,5)	
Estação Seca (março-agosto)			
Infectado	0 (0)	87 (6,6)	<0,001
Não Infectado	603 (100)	1226 (93,4)	
Estação Chuvosa (setembro-fevereiro)			
Infectado	30 (2,1)	68 (2,2)	0,913
Não Infectado	1399 (97,9)	3010 (97,8)	

*Teste qui-quadrado de Pearson

N- Frequência absoluta; % - frequência relativa percentual.

Características ambientais, físico-químicas e microbiológicas

Os resultados das análises físico-químicas da água e sedimento foram obtidos e comparados entre os pontos praia e rural. Ao realizar essa comparação na estação seca, percebeu-se que a precipitação (30,3 mm), temperatura (28,9 °C), condutividade (0,7 ms/cm²), Turbidez (15,6 NTU), Salinidade (0,3 mg/L) e Sólidos Totais Dissolvidos (335,7 STD) da água e o pH (7,2) e Manganês (24,2) do sedimento, apresentaram maiores valores na praia quando comparados com os resultados do ponto rural. Em relação ao diâmetro da concha (12,3 mm), pH (6,4), oxigênio dissolvido (11,1ppm) da

água, e cálcio + magnésio (15,4), cálcio (10,7), alumínio (0,7), sódio (126,4), potássio (78,5), fósforo (64,7), matéria orgânica (33,3), magnésio (2,9), ferro (1231,3), cobre (12,3) e zinco (20,2) do sedimento, apresentaram maiores valores no ponto rural. Foram observadas diferenças significativas em todas as características ambientais, físico-químicas e biológicas (Tabela 2).

Tabela 2 Distribuição de parâmetros ambientais e do molusco na estação seca, comparando dois pontos de coleta de moluscos (praia e rural) nos municípios de Aracaju e São Cristóvão-Sergipe, Brasil.

Parâmetros	Estação Seca				p
	Praia		Rural		
	Media (DP)	Mediana (min - max)	Media (DP)	Mediana (min - max)	
Diâmetro da concha	7,9 (1,8)	7,9 (3,4 - 15,4)	12,3 (3,5)	12,3 (3 - 25,5)	<0,001
Precipitação (mm)	30,3 (12,4)	37,4 (8,6 - 37,4)	23,6 (18,4)	10,8 (6,8 - 50,7)	<0,001
Água					
Temperatura °C	28,9 (0)	28,9 (28,9 - 29)	27,4 (1,1)	27 (25 - 28,6)	<0,001
pH	6,2 (0)	6,2 (6,1 - 6,2)	6,4 (0,4)	6,2 (6,1 - 7,9)	<0,001
Condutividade (ms/cm²)	0,7 (0)	0,7 (0,7 - 0,7)	0,4 (0,1)	0,4 (0,3 - 0,6)	<0,001
Turbidez (NTU)/água	15,6 (0,1)	15,6 (15,6 - 15,7)	14,5 (1,5)	14,2 (9,9 - 15,8)	<0,001
Oxigênio dissolvido (ppm)	10,5 (0)	10,5 (10,5 - 10,6)	11,1 (0,1)	11,1 (11,1 - 11,8)	<0,001
Salinidade	0,3 (0)	0,3 (0,3 - 0,3)	0,2 (0)	0,2 (0,2 - 0,2)	<0,001
Sólidos Totais Dissolvidos (STD)	335,7 (1,3)	335 (335 - 338)	132,2 (5,9)	132 (128 - 153)	<0,001
Sedimento					
pH	7,2 (0)	7,2 (7,2 - 7,2)	6,6 (0,2)	6,6 (6,2 - 7,2)	<0,001
Cálcio + Magnésio	1,4 (0,2)	1,3 (1,3 - 1,8)	15,4 (0,9)	15,7 (13,4 - 16,2)	<0,001
Cálcio	1,8 (0)	1,8 (1,8 - 1,8)	10,7 (1,1)	11,1 (9,1 - 12,8)	<0,001
Alumínio	0,4 (0,2)	0,3 (0,3 - 0,7)	0,7 (0,1)	0,7 (0,4 - 0,8)	<0,001
Sódio	26,4 (0,4)	26,1 (26,1 - 27,2)	126,4 (1,8)	127 (122 - 128)	<0,001
Potássio	17 (0,1)	17,1 (16,8 - 17,1)	78,5 (12,6)	87,8 (60,7 - 91,9)	<0,001
Fósforo)	11,5 (0,3)	11,3 (11,3 - 12)	64,7 (2,7)	64 (62 - 72)	<0,001
Matéria Orgânica	6,6 (0,3)	6,8 (6,2 - 6,8)	33,3 (0,6)	33,4 (30,2 - 33,8)	<0,001
Magnésio	1,5 (0)	1,5 (1,5 - 1,6)	2,9 (0,3)	2,8 (2,4 - 3,5)	<0,001
Ferro (Fe)	460,9 (10,3)	455,1 (455,1 - 478,9)	1231,3 (42,9)	1223,9 (1115,9 - 1322,1)	<0,001
Manganês	24,2 (0,2)	24,3 (24 - 24,3)	23,8 (0,9)	23,8 (22 - 25,8)	<0,001
Cobre (Cu)	0 (0)	0 (0 - 0)	12,3 (0,5)	12,1 (11,9 - 13,8)	<0,001
Zinco (Zn)	0,9 (0)	0,9 (0,8 - 0,9)	20,2 (0,3)	20,2 (19,3 - 21,1)	<0,001

Legenda: DP - desvio padrão; min - mínimo; max - máximo; Teste T;

No entanto, no período chuvoso, foi notada uma diminuição das variáveis com valores maiores quando comparada com o ponto rural, nas quais apenas a precipitação (144,7 mm), pH (7,3), condutividade (0,5 ms/cm²), salinidade (0,2 mg/L), sólidos totais dissolvidos (215,8 STD) na água, apresentaram maiores valores na praia. Enquanto o diâmetro da concha (12,9 mm), temperatura (26,1 °C), turbidez (14,1 NTU), oxigênio dissolvido (9,3 ppm) da água, pH (7,2), cálcio + magnésio (14,7), cálcio (11,2), Alumínio (0,5), sódio (128,9), potássio (85,7), fósforo (72,6), matéria orgânica (34,5), magnésio (3,1), ferro (1300), manganês (25,6), cobre (13), zinco (20,2) do sedimento, apresentaram maiores valores na área rural. Não houve diferença significativa entre a precipitação (mm) e pH/água (Tabela 3).

Tabela 3 Distribuição de parâmetros ambientais e do molusco na estação chuvosa, comparando os dois pontos de coleta de moluscos (praia e rural) dos municípios de Aracaju e São Cristóvão-Sergipe, Brasil.

	Estação Chuvosa				
	Praia		Rural		
	Media (DP)	Mediana (min - max)	Media (DP)	Mediana (min - max)	p*
Diâmetro da concha	9,6 (3,6)	8,9 (1 - 23,1)	12,9 (3,5)	13 (3 - 25)	<0,001
Precipitação(mm)	144,7 (75,3)	171,1 (41,8 - 350,8)	140,3 (68,9)	171,6 (28,7 - 350,8)	0,054
ÁGUA					
Temperatura	26,1 (1,6)	25 (25 - 28,7)	26,2 (0,6)	26 (25 - 27,6)	<0,001
pH/água	7,3 (0,4)	7,5 (6,5 - 7,7)	7,2 (0,3)	7,1 (6,8 - 7,8)	0,141
Condutividade (ms/cm²)	0,5 (0,2)	0,4 (0,4 - 0,7)	0,4 (0,1)	0,3 (0,3 - 0,5)	<0,001
Turbidez (NTU)/água	13,1 (1,5)	12,2 (11,2 - 15,7)	14,1 (1,4)	14,3 (9,2 - 15,9)	<0,001
Oxigênio dissolvido (ppm)	7,5 (2)	6,2 (6 - 10,8)	9,3 (0,8)	9,1 (7,6 - 11,2)	<0,001
Salinidade (mg/L)	0,2 (0)	0,2 (0,2 - 0,3)	0,2 (0)	0,2 (0,1 - 0,2)	<0,001
Sólidos Totais Dissolvidos (STD)	215,8 (41,9)	197 (172 - 296)	112,8 (10,6)	110 (106 - 141)	<0,001
SEDIMENTO					
pH	6,4 (0,5)	6 (6 - 7,2)	7,2 (0,4)	7,5 (6,2 - 7,6)	<0,001
Cálcio + Magnésio	1,4 (0,2)	1,2 (1,2 - 2,1)	14,7 (0,5)	14,6 (14 - 15,8)	<0,001
Cálcio	1,2 (0,2)	1 (1 - 1,9)	11,2 (0,8)	11,1 (10 - 15)	<0,001
Alumínio	0,4 (0,2)	0,3 (0,3 - 0,8)	0,5 (0,3)	0,4 (0,2 - 0,8)	<0,001
Sódio	27,3 (0,6)	27,5 (25 - 27,5)	128,9 (2,8)	130 (122 - 133)	<0,001
Potássio	17,3 (0,5)	17,1 (16,1 - 18,2)	85,7 (6,3)	85,6 (67,5 - 92,3)	<0,001
Fósforo	11,5 (0,2)	11,5 (11,1 - 12,1)	72,6 (3,6)	75 (63 - 76)	<0,001
Matéria Orgânica	7,1 (0,1)	7,1 (6,8 - 7,3)	34,4 (0,6)	34,5 (33,2 - 35,1)	<0,001
Magnésio	1,3 (0,2)	1,2 (1,1 - 1,8)	3,1 (0,2)	3,1 (2,7 - 3,4)	<0,001
Ferro (Fe)	463,7 (18,3)	458,2 (423,6 - 505,6)	1300 (35,4)	1289,9 (1222,1 - 1344,5)	<0,001
Manganês	23,6 (0,6)	23,4 (21,1 - 24,4)	25,6 (1,1)	25,7 (23,2 - 26,9)	<0,001
Cobre (Cu)	0 (0)	0 (0 - 0)	13 (0,7)	12,9 (11,7 - 13,8)	<0,001
Zinco (Zn)	0,9 (0)	0,9 (0,9 - 1)	20,2 (0,4)	20,1 (19,2 - 21,1)	<0,001

* teste T

Na tabela 4 são apresentados os coeficientes padronizados e não padronizados dos parâmetros físico-químicos associados ao diâmetro da concha do molusco. Foi observado que todos os parâmetros físico-químicos observados na análise apresentaram diferença significativa ($p < 0.001$). Os parâmetros de temperatura, turbidez, salinidade e oxigênio dissolvido da água influenciam negativamente no diâmetro da concha. Entretanto os valores dos parâmetros analisados do solo influenciam positivamente (por exemplo, cálcio e ferro) no diâmetro da concha.

Tabela 4 Coeficientes padronizados e não padronizados dos parâmetros físico-químicos associados ao diâmetro da concha de moluscos *B. glabrata* coletados em dois pontos (praia e rural) dos municípios de Aracaju e São Cristóvão-Sergipe, Brasil.

	Diâmetro da Concha		P
	B (IC 95%)	β	
ÁGUA			
Temperatura/água	-0,387 (-0,458; -0,317)	-0,133	<0,001
pH/água	1,159 (0,989;1,329)	0,164	<0,001
Condutividade (ms/cm ²)	-9,685 (-10,288;-9,082)	-0,366	<0,001
Turbidez (NTU)	-0,240 (-0,300;-0,179)	-0,097	<0,001
Oxigênio dissolvido (ppm)	0,161 (0,105;0,217)	0,070	<0,001
Salinidade (mg/L)	-27,692 (-29,228;-26,156)	-0,404	<0,001
Sólidos Totais Dissolvidos (STD)	-0,024 (-0,025;-0,023)	-0,447	<0,001
SEDIMENTO			
pH	0,295 (0,125;0,466)	0,042	<0,001
Cálcio + Magnésio	0,257 (0,244;0,271)	0,424	<0,001
Cálcio	0,358 (0,339;0,376)	0,427	<0,001
Alumínio	1,535 (1,135;1,935)	0,093	<0,001
Sódio	0,035 (0,033;0,037)	0,431	<0,001
Potássio	0,049 (0,047;0,052)	0,408	<0,001
Fósforo	0,059 (0,056;0,062)	0,427	<0,001
Matéria Orgânica	0,133 (0,126;0,139)	0,436	<0,001
Magnésio	1,888 (1,784;1,991)	0,407	<0,001
Ferro (Fe)	0,004 (0,004;0,004)	0,424	<0,001
Manganês	0,534 (0,462;0,605)	0,180	<0,001
Cobre (Cu)	0,307 (0,169;0,445)	0,066	<0,001
Zinco (Zn)	0,189 (0,179;0,198)	0,441	<0,001

Regressão linear; B - coeficientes não ajustados; β - coeficientes não ajustados padronizados;

Na tabela 5, são apresentados os valores dos parâmetros físico-químicos levando em consideração os moluscos não infectados e infectados. Houve diferenças estatisticamente significativas ($p = < 0.001$) em relação aos parâmetros obtidos da água, como temperatura (26,3 °C), turbidez (14,2), oxigênio dissolvido (10,3), sólidos totais dissolvidos (152,7) e parâmetros retirados do solo como cálcio+magnésio (13), cálcio (10), alumínio (0,6), potássio (73,1), ferro (1148,6 Fe), zinco (17,2), que apresentaram valores maiores no grupo de moluscos infectados.

Tabela 5 Distribuição dos parâmetros físico-químicos associados ao grupo de moluscos *B. glabrata* infectados e não infectados coletados em dois pontos (praia e rural) dos municípios de Aracaju e São Cristóvão-Sergipe, Brasil.

	Não infectado (1) Infectado (2)				M-W
	Não infectado		Infectado		
	Media (DP)	Mediana (min - max)	Media (DP)	Mediana (min - max)	
ÁGUA					
Temperatura °C	26,7 (1,3)	26,4 (25-29)	26,3 (1,4)	26 (25-28,7)	<0,001
pH	7 (0,5)	7,1 (6,1-7,9)	6,9 (0,5)	6,8 (6,12-7,9)	0,023
Condutividade (ms/cm²) água	0,4 (0,1)	0,378 (0,304-0,732)	0,4 (0,1)	0,402 (0,304-0,731)	0,052
Turbidez (NTU)	14,1 (1,5)	14,3 (9,2-15,85)	14,2 (2,1)	15,38 (9,2-15,85)	<0,001
Oxigênio dissolvido (ppm)	9,3 (1,7)	9,08 (5,96-11,79)	10,3 (1,3)	11,09 (6,2-11,79)	<0,001
Salinidade	0,2 (0,1)	0,18 (0,12-0,32)	0,2 (0,1)	0,18 (0,12-0,32)	0,606
Sólidos Totais Dissolvidos (STD)	160,8 (72,9)	128 (106-338)	152,7 (59)	135 (106-296)	0,017
SEDIMENTO					
pH	6,9 (0,6)	7,14 (6,01-7,57)	7 (0,4)	7,15 (6,01-7,51)	0,951
Cálcio + Magnésio	10,6 (6,4)	14,3 (1,2-16,2)	13 (5,1)	15,11 (1,2-16,2)	<0,001
Cálcio	7,9 (4,6)	11 (1-15)	10 (4)	11,15 (1-14)	<0,001
Alumínio	0,5 (0,2)	0,5 (0,2-0,8)	0,6 (0,2)	0,7 (0,2-0,8)	<0,001
Sódio	95,8 (47,3)	127 (25,01-133)	109,3 (36,2)	122 (27,5-133)	0,015
Potássio	62,3 (31,9)	80,6 (16,14-92,3)	73,1 (25,7)	85,6 (17,1-90,6)	<0,001
Fósforo	51,4 (27,8)	67 (11,1-76)	58,9 (21,2)	68 (11,17-75)	0,430
Matéria Orgânica	25,4 (12,7)	33,4 (6,15-35,1)	29,1 (9,7)	32,5 (7,12-34,9)	0,226
Magnésio	2,5 (0,8)	3 (1,1-3,5)	2,6 (0,6)	2,7 (1,2-3,4)	0,147
Ferro (Fe)	1017,3 (383,5)	1223,9 (423,6-1344,5)	1148,6 (304,7)	1286,8 (458,2-1331,2)	<0,001
Manganês	24,7 (1,3)	24,33 (21,11-26,85)	24,9 (1)	25,23 (23,09-26,42)	0,004
Cobre (Cu)	12,8 (0,8)	12,92 (11,72-13,84)	12,6 (0,6)	12,33 (11,72-13,78)	0,066
Zinco (Zn)	14 (9)	20,1 (0,79-21,12)	17,2 (7,2)	20,21 (0,91-21,12)	<0,001

Legenda: DP - desvio padrão; min - mínimo; max - máximo; M-W - teste de Mann-Whitney;

Nos pontos de coleta foram observadas macrófitas aquáticas e as análises microbiológicas da água, revelaram positividade para coliformes totais e *E. coli*, em ambos os períodos climáticos, seco e chuvoso.

Gradiente de salinidade

Os resultados do teste de sobrevivência de *B. glabrata* à diferentes salinidades, estão representados na tabela 6, em que foram comparados a média do número de sobreviventes entre os pontos Praia e Rural, em relação a diluição e tempo. Foram observadas diferenças significativas pequenas ($D < 0,2$) quanto aos locais, na praia foi

observada menor sobrevivência quando comparado ao ponto rural. Quanto às concentrações de 10%, 15%, 20% e 35% todas com diferenças medianas ($D > 0,5$); quanto aos momentos de 3, 6 e 12h com diferenças pequenas a mediana ($0,2 < D < 0,5$). Dos moluscos coletados na praia, nas respectivas diluições de 5 a 20% e 35% em todo tempo de análise, não houve moluscos sobreviventes. Permanecendo vivos, os moluscos expostos às diluições de 25 e 30% e 40 a 95%. Porém o grupo de moluscos coletados do ponto rural se encontravam vivos em todas as diluições, exceto de 5%. Todos os moluscos do controle positivo permaneceram vivos até o final do experimento (24 horas). Vale ressaltar, que as concentrações de salinidade eram iguais para ambos os grupos de moluscos dos pontos.

Tabela 6 Moluscos *B. glabrata* de dois pontos de coleta (praia e rural) sobreviventes ao teste de gradiente de salinidade. Municípios de Aracaju e São Cristóvão-Sergipe, Brasil.

	Ponto				p	D-Cohen
	Praia		Rural			
	Média (DP)	Med (Min-Max)	Média (DP)	Med (Min-Max)		
Local	12,76 (11,61)	13 (0-30)	20,12 (11,22)	25 (0-30)	<0,001^W	0,153
Diluição						
5%	0 (0)	0 (0-0)	0 (0)	0 (0-0)	1,000 ^W	*
10%	0 (0)	0 (0-0)	13,2 (9,52)	16 (0-25)	0,019^W	0,587
15%	0 (0)	0 (0-0)	16,8 (12,48)	20 (0-29)	0,019^W	0,578
20%	0 (0)	0 (0-0)	16 (11,77)	19 (0-28)	0,019^W	0,581
25%	14,8 (10,62)	12 (0-27)	16,2 (11,21)	19 (0-27)	0,844 ^T	0,150
30%	13,2 (7,82)	14 (0-20)	18,2 (11,17)	24 (0-27)	0,436 ^T	0,302
35%	0 (0)	0 (0-0)	17,2 (11,63)	21 (0-27)	0,018^W	0,606
40%	15 (10,77)	17 (1-25)	21,2 (12,28)	25 (0-30)	0,421 ^T	0,307
45%	16,4 (11,01)	21 (0-28)	25,6 (8,76)	30 (10-30)	0,090 ^W	0,403
50%	13,4 (11,22)	10 (2-30)	26,8 (6,61)	30 (15-30)	0,085 ^W	0,506
55%	15,6 (10,64)	15 (1-30)	21,8 (10,31)	24 (5-30)	0,377 ^T	0,322
60%	17,2 (10,78)	17 (1-30)	23,4 (9,61)	27 (7-30)	0,365 ^T	0,327
65%	20,2 (11,78)	26 (1-30)	23,6 (9,61)	27 (7-30)	0,525 ^W	0,236
70%	20,8 (11,19)	24 (2-30)	23,6 (9,18)	27 (8-30)	0,597 ^W	0,219
75%	21,8 (11,08)	26 (3-30)	23 (11,45)	28 (3-30)	0,671 ^W	0,137
80%	20,4 (11,28)	22 (2-30)	23,8 (11,19)	29 (4-30)	0,396 ^W	0,231
85%	20,6 (11,1)	24 (3-30)	23,6 (12,14)	29 (2-30)	0,525 ^W	0,213
90%	15,6 (11,1)	15 (1-30)	23,8 (12,26)	30 (2-30)	0,196 ^W	0,351
95%	17,4 (10,88)	17 (2-30)	24,4 (11,44)	30 (4-30)	0,196 ^W	0,332
Tempo						
1h	21,05 (13,16)	30 (0-30)	27,53 (6,83)	30 (0-30)	0,234 ^W	0,227
3h	17,84 (11,42)	22 (0-29)	26,58 (7,23)	30 (0-30)	<0,001^W	0,276
6h	13,68 (9,51)	15 (0-26)	23,95 (7,28)	27 (0-30)	<0,001^W	0,318
12h	10,21 (7,39)	12 (0-21)	19 (8,87)	23 (0-29)	0,004^W	0,299
24h	1 (1,05)	1 (0-3)	3,53 (4,25)	2 (0-15)	0,117 ^W	0,261

Legenda: DP – Desvio Padrão; Med – Mediana; Mín – Mínimo; Max – Máximo; ^T – Teste T de Student; ^W – Teste de Mann-Whitney; D-Cohen – Tamanho de Efeito d de Cohen.

Foram detectadas diferenças significativas quanto ao tempo, à diluição e local, além de significativos nas análises entre diluição e local, tempo e local (tabela 7). Não houve diferenças significativas nas análises entre tempo e diluição. O modelo apresentou um ajuste adequado ($R^2=0,98$; $R^2_{adj}=0,953$).

Tabela 7 Resultados de modelo linear geral do teste de tolerância a Salinidade para moluscos *Biomphalaria glabrata* de dois pontos de coleta (praia e rural) dos municípios de Aracaju e São Cristóvão-Sergipe, Brasil.

	SQ	GL	QM	F	p-valor
Tempo	11586,5	4	2896,6	148,0	0,000
Diluição	8159,2	18	453,3	23,2	0,000
Local	2571,6	1	2571,6	131,4	0,000
Diluição * Local	1359,5	18	75,5	3,9	0,000
Tempo * Diluição	1643,5	72	22,8	1,2	0,258
Tempo * Local	346,9	4	86,7	4,4	0,003
Erro	1409,5	72	19,6		
Total	78409,0	190			

$R^2= 0,982$

$R^2_{adj}= 0,953$

Legenda: SQ – Soma dos Quadrados; GL – Grau de Liberdade; QM – Quadrado Médio; F – Estatística F de Fisher-Snedecor.

Na tabela 8 e na Figura 2a (curvas ROC) são mostrados os resultados da análise de acurácia para detecção de um ponto ótimo de letalidade para diluição para cada local com área abaixo da curva da região da praia de 0,779 (figura 2b). Analisando as métricas propostas, a diluição de 37,5% apresenta-se com melhores características, em que são previstos um 58,5% de não sobreviventes (sensibilidade) e um 79,6% de sobreviventes (especificidade). Quanto às métricas de avaliação, este ponto da curva foi o de melhor valor no Índice de Youden (maior), proximidade do ponto de 0,1 (menor) e maior probabilidade de concordância. Quanto ao Índice de União foi apenas o 5º melhor.

Tabela 8 Análise de acurácia para detecção de um ponto ótimo de letalidade para diluição

	SE	ES	J	ER	IU	CZ
Diluição						
7,5	12,2%	100,0%	0,122	0,878	0,878	0,122
12,5	20,7%	97,2%	0,180	0,793	0,765	0,202
17,5	29,3%	94,4%	0,237	0,709	0,652	0,276
22,5	37,8%	91,7%	0,295	0,628	0,539	0,347
27,5	43,9%	87,0%	0,309	0,576	0,431	0,382
32,5	50,0%	82,4%	0,324	0,530	0,324	0,412
37,5	58,5%	79,6%	0,382	0,462	0,211	0,466
42,5	62,2%	73,1%	0,353	0,464	0,110	0,455
47,5	65,9%	66,7%	0,325	0,477	0,111	0,439
52,5	70,7%	61,1%	0,318	0,487	0,117	0,432
57,5	75,6%	55,6%	0,312	0,507	0,201	0,420
62,5	79,3%	49,1%	0,283	0,550	0,302	0,389
67,5	81,7%	41,7%	0,234	0,611	0,400	0,340
72,5	84,1%	34,3%	0,184	0,676	0,499	0,288

Tabela 8 Análise de acurácia para detecção de um ponto ótimo de letalidade para diluição

77,5	86,6%	26,9%	0,134	0,744	0,597	0,232
82,5	89,0%	19,4%	0,085	0,813	0,696	0,173
87,5	91,5%	12,0%	0,035	0,884	0,794	0,110
92,5	96,3%	6,5%	0,028	0,936	0,899	0,062
AUC	0,718					

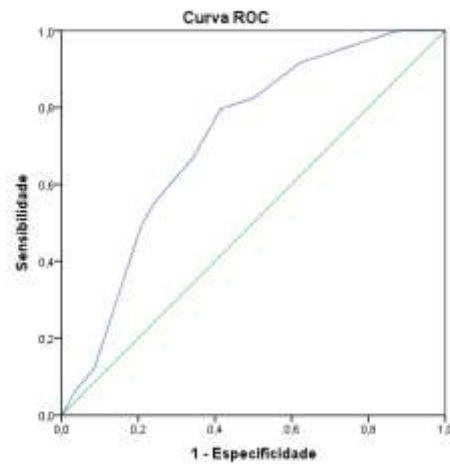
Legenda: SE – Sensibilidade; ES – Especificidade; J - Índice de Youden; ER – Proximidade do ponto (0,1); IU – Índice de União; CZ – Probabilidade de Concordância.

A tabela 9 e a Figura 2 (curvas ROC) apresentam os resultados da análise de acurácia para detecção de um ponto ótimo de letalidade de diluição para cada local com áreas abaixo da curva da região da praia de 0,779 (figura 2b) e da área rural de 0,680 (figura 2c). Analisando as métricas propostas para a praia, sugere-se a diluição de 52,5% por possuir uma melhor equidade entre sensibilidade e especificidade, com menor distância ao ponto (0,1), e segundo menor índice de União. Os demais índices de qualidade do ponto embora não sejam os melhores, mas são próximos aos melhores. Entretanto para a área rural, é sugerida a diluição de 37,5% com baixa sensibilidade, mas alta especificidade com maior índice de Youden e probabilidade de concordância e a terceira menor distância ao ponto (0,1) e índice de União.

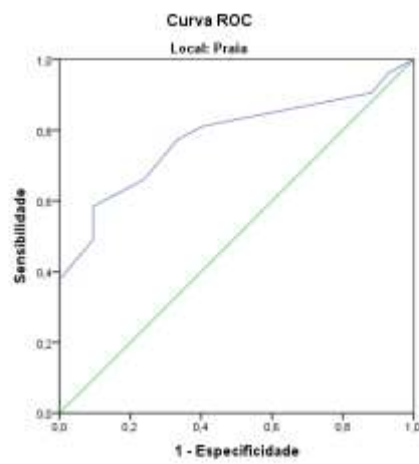
Tabela 9 Análise de acurácia para detecção de um ponto ótimo de letalidade de diluição para cada local

%	Praia						Rural					
	SE	ES	J	ER	IU	CZ	SE	ES	J	ER	IU	CZ
7,5	0,094	1,000	0,094	0,906	0,906	0,094	17,2%	100,0%	0,172	0,828	0,828	0,172
12,5	0,189	1,000	0,189	0,811	0,811	0,189	24,1%	95,5%	0,196	0,760	0,713	0,230
17,5	0,283	1,000	0,283	0,717	0,717	0,283	31,0%	90,9%	0,219	0,696	0,599	0,282
22,5	0,377	1,000	0,377	0,623	0,623	0,377	37,9%	86,4%	0,243	0,635	0,484	0,328
27,5	0,434	0,952	0,386	0,568	0,518	0,413	44,8%	81,8%	0,266	0,581	0,370	0,367
32,5	0,491	0,905	0,395	0,518	0,414	0,444	51,7%	77,3%	0,290	0,534	0,255	0,400
37,5	0,585	0,905	0,490	0,426	0,320	0,529	58,6%	72,7%	0,313	0,496	0,141	0,426
42,5	0,623	0,833	0,456	0,413	0,211	0,519	62,1%	66,7%	0,287	0,505	0,073	0,414
47,5	0,660	0,762	0,422	0,415	0,135	0,503	65,5%	60,6%	0,261	0,524	0,099	0,397
52,5	0,717	0,714	0,431	0,402	0,126	0,512	69,0%	54,5%	0,235	0,550	0,144	0,376
57,5	0,774	0,667	0,440	0,403	0,117	0,516	72,4%	48,5%	0,209	0,584	0,239	0,351
62,5	0,811	0,595	0,407	0,447	0,216	0,483	75,9%	42,4%	0,183	0,624	0,334	0,322
67,5	0,830	0,500	0,330	0,528	0,330	0,415	79,3%	36,4%	0,157	0,669	0,429	0,288
72,5	0,849	0,405	0,254	0,614	0,444	0,344	82,8%	30,3%	0,131	0,718	0,525	0,251
77,5	0,868	0,310	0,177	0,703	0,558	0,269	86,2%	24,2%	0,104	0,770	0,620	0,209
82,5	0,887	0,214	0,101	0,794	0,673	0,190	89,7%	18,2%	0,078	0,825	0,715	0,163
87,5	0,906	0,119	0,025	0,886	0,787	0,108	93,1%	12,1%	0,052	0,881	0,810	0,113
92,5	0,962	0,071	0,034	0,929	0,891	0,069	96,6%	6,1%	0,026	0,940	0,905	0,059
AUC	0,779						0,680					

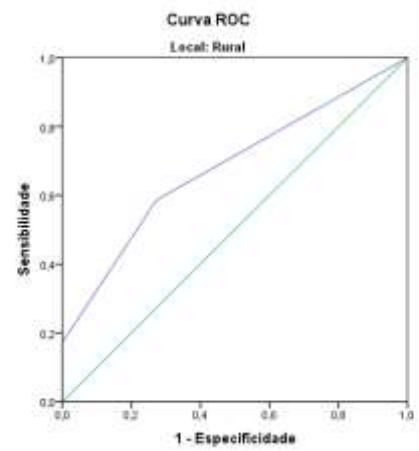
Legenda: SE – Sensibilidade; ES – Especificidade; J - Índice de Youden; ER – Proximidade do ponto (0,1); IU – Índice de União; CZ – Probabilidade de Concordância.



(a)



(b)



(c)

Figura 2 Curvas ROC de diluição e letalidade de moluscos *Biomphalaria glabrata* (A- Sensibilidade e especificidade; B- Praia; C- Rural).

Discussão

Este estudo abordou os fatores ambientais e biológicos devido ao encontro de hospedeiros intermediários do *S. mansoni* em coleções hídricas oriundas do despejo de águas pluviais e de ação antrópica, em praia urbana do município de Aracaju/Sergipe-Brasil. Consequentemente, também gerou questionamentos a respeito da sobrevivência dos hospedeiros, nesta área. Fizeram-se então necessárias a coleta de informações sobre a ocorrência e infecção desses hospedeiros, como também a avaliação de parâmetros físico-químicos do ambiente em que estes moluscos foram encontrados, comparado com o ambiente rural. Historicamente característico de focos de transmissão de esquistossomose mansônica.

Os resultados deste trabalho revelam que *B. glabrata* é uma espécie resistente à condições ambientais adversas e permanece propícia para transmissão da esquistossomose. Um fator preocupante e que contribui para a sobrevivência desses moluscos em novas regiões o estabelecimento da doença em novas áreas geográficas [20]. O nordeste do Brasil é relatado como a principal região geográfica responsável pela transmissão da esquistossomose mansônica [21], seja pela prevalência de casos humanos ou o encontro de focos de *Biomphalaria* [22]. Nos pontos de coleta (praia e rural) avaliados nesta pesquisa, foram encontrados moluscos infectados pelo *S. mansoni*, desta forma, ambas as áreas podem ser consideradas como focos potenciais de transmissão da esquistossomose, uma vez que se trata de áreas com constante atividade humana, seja pelo turismo no ponto praia e crescimento imobiliário em ambos os pontos. Outros autores, também encontraram a mesma espécie de molusco infectada pelo *S. mansoni*, em áreas rurais e urbanas, no município de São Cristóvão, além de mostrar resultados positivos de casos humanos com base em dados do PCE - Programa de Controle da Esquistossomose [7-23-24].

Ao comparar os pontos de estudo em relação à infecção dos moluscos na estação seca e chuvosa, a análise se mostrou estatisticamente significativa quanto à comparação dos pontos na estação de seca, porém os moluscos da praia estavam infectados apenas na estação chuvosa, diferente dos moluscos do ponto rural que estavam infectados em ambos os períodos. Vários estudos mostram o efeito da chuva em relação à abundância e infecção parasitária de *B. glabrata* [7-22-23-25], nos quais é mostrada a influencia das precipitações tanto na ocorrência quanto na infecção dos moluscos. Ressalta-se que o número de moluscos coletados neste estudo foi maior no período de chuvas, assim como relatado nas pesquisas destes autores [22]. Por outro lado, os períodos de fortes

chuvas propiciam o alastramento dos moluscos, elevando as chances de contato com o homem e, conseqüentemente, a transmissão da esquistossomose [26-27].

O conhecimento da infecção dos moluscos da praia, local este, que possui um alto apelo turístico e, sendo a esquistossomose uma importante infecção que pode estar associada a viajantes [28], se torna relevante a fim de compreender e minimizar os riscos de infecção [29] para a população local e turística. De acordo com Allan e col. [30] que realizaram estudos com mapeamento da transmissão de esquistossomose, afirmam que são importantes os estudos malacológicos na contribuição para o planejamento de intervenções para o controle da doença.

Os estudos dos fatores ambientais de criadouros são importantes para se compreender a distribuição, infecção e sobrevivência de *B. glabrata* [31]. As variáveis físico-químicas desta pesquisa evidenciaram na estação seca, diferenças significativas em todas as categorias analisadas e quando comparadas entre os pontos de coleta. Nas estações de seca e de chuva, as características físico-químicas da água e sedimento estavam dentro dos limites de tolerância de *B. glabrata*, que pode tolerar, por exemplo, faixas relativamente amplas de temperatura, pH, condutividade, cálcio, sódio e potássio, oxigênio dissolvido e turbidez [13].

No entanto, na análise do sedimento, houve valores muito elevados de Ferro e ausência de Cobre no ponto praia, sendo que estes elementos são essenciais na manutenção da homeostase celular, incluindo o sistema imunológico, em que o ferro em excesso na hemolinfa do molusco, pode provocar tanto aumento como deficiência da função humoral, e a ausência do cobre colabora também para esta deficiência [32]. O cálcio é outro elemento importante e diretamente relacionado com a sobrevivência e crescimento de *B. glabrata* [18], fundamental para a biomineralização da concha [8]. O que certamente chama a atenção são os valores muito baixos de cálcio no sedimento encontrados nesse estudo, e que a espécie parece tolerar sem trazer conseqüências aparentes a seu desenvolvimento (diâmetro da concha variando em média de 7,9 a 12,9 mm) e sobrevivência no ambiente de estudo. Além da importância do cálcio em relação ao crescimento da concha, outros estudos apontam que o diâmetro da concha pode variar quando correlacionado com a precipitação [7-23], o que corrobora com os resultados desta pesquisa (tabela 3), que mostram maiores médias de diâmetro em épocas de maior precipitação.

Na análise de regressão linear, quando comparados os parâmetros físico-químicos associados ao diâmetro da concha, também foi observada diferença

significativa, entretanto os parâmetros de temperatura, turbidez, salinidade e oxigênio dissolvido da água se encontraram influenciando negativamente, mesmo estando dentro de valores tolerados por *B. glabrata*. Entretanto os valores dos parâmetros analisados do solo se encontraram influenciando positivamente, destaque para os parâmetros de ferro e cálcio, que mesmo com valores altos ou baixos, possuem efeitos importantes para as funções celulares, e podem ser considerados como imunomoduladores essenciais para as funções imunológicas [31].

Em relação aos moluscos não infectados e infectados, houve diferenças estatisticamente significativas nos parâmetros físico-químicos obtidos da água, apenas a salinidade não foi significativa. Os valores dos parâmetros do sedimento como cálcio+magnésio, cálcio, alumínio, potássio, ferro, manganês e zinco, foram maiores no grupo infectado. Estes parâmetros, também foram avaliados por Barbosa e col., ao realizarem análises do sedimento de criadouros litorâneos, onde eles discutem que os moluscos por meio da digestão de água formam as metalproteínas, fundamentais ao seu desenvolvimento, devido à sintetização dos metais presentes no sedimento e meio hídrico [20].

A confirmação da presença de coliformes totais e *E. coli* nos pontos pesquisados é uma questão preocupante, uma vez que a contaminação desses ambientes atua como mais um fator para manutenção do ciclo da esquistossomose nas localidades pesquisadas. Essa análise é relevante porque proporciona a confirmação da presença de resíduos fecais humanos na água onde os moluscos foram encontrados [20-22].

É imprescindível o entendimento dos fatores ambientais que permitem a sobrevivência dos moluscos encontrados na praia de Aracaju, comparados a moluscos de ambiente rural, e juntamente a este, identificar a existência de possíveis diferenças nas características ambientais dos criadouros. Embora não tenham sido observados valores altos de salinidade nas amostras hídricas do ponto praia, os resultados do experimento para testar a sobrevivência de *B. glabrata* às salinidades revelaram dentro da proporção diluída e tempo diferenças significativas pequenas ($D < 0,2$) quanto aos locais. Os moluscos coletados na praia resistiram menos à salinidade, ocorrendo sobrevivência nas diluições (25 e 30% e 40 a 95%), porém o grupo experimental coletado em área rural e submetido ao teste sobreviveu em todas as diluições exceto de 5%. O que demonstra que a espécie está extremamente tolerante a variação de concentrações salinas nas águas, conclusão esta, também atribuída por outros autores que encontraram moluscos sobrevivendo a valores de salinidades altas [20-32].

De acordo com uma pesquisa realizada em 2006 [33], a constatação obtida no gradiente de salinidade, pode ter ocorrido devido à pressão osmótica exercida em função da diferença de concentração de eletrólitos entre o meio interno (animal) e externo (solução), através da permeabilidade seletiva existentes nas membranas celulares. Pois o autor realizou teste de salinidade com moluscos de campo e de laboratório e constatou que as espécies em um ambiente mais salino, quando exposta a baixas concentrações de sal não conseguem prevenir a entrada de água no seu interior, rompendo, portanto as suas células, já as espécies de ambientes menos salinos conseguem equilibrar a pressão interna com a pressão externa sentindo os efeitos da pressão dos eletrólitos apenas em concentrações maiores que rompem esse equilíbrio. Contudo os moluscos coletados da praia não conseguem minimizar a entrada excessiva de água, morrendo a baixas concentrações. Já os moluscos de ambiente rural, conseguem tornar mais seletiva a permeabilidade celular, prevenindo a entrada de água e, portanto resistindo mais ao efeito dos gradientes de concentração.

Conclusão

É relevante o estudo das características do habitat natural da espécie *B. glabrata* tendo em vista a sua importância como hospedeiro intermediário da esquistossomose mansônica. Este estudo revelou a presença de moluscos eliminando cercarias de *S. mansoni*, bem como sua resistência e sobrevivência a fatores físico-químicos aparentemente pouco adequados, tanto em ambiente de praia como em ambiente rural. Alguns episódios de transmissão e disseminação da esquistossomose envolvendo turistas têm sido identificadas no litoral de outras cidades brasileiras, sendo assim, se faz necessário um contínuo estudo das populações de moluscos em diferentes áreas de risco de contrair a doença, com o intuito de melhor conhecimento dos fatores que facilitam a sobrevivência destes moluscos. Este estudo evidenciou características ambientais particulares que contribuem para sobrevivência e constante colonização da espécie, o que pode gerar a formação/manutenção de focos de transmissão da esquistossomose na área.

Referências

1. Le Clec'h W, Anderson TJC, Chevalier FD. Characterization of hemolymph phenoloxidase activity in two *Biomphalaria* snail species and impact of *Schistosoma mansoni* infection. *Parasit Vectors*. 2016;9:32.
2. Galinier R, Tetreau G, Portet A, Pinaud S, Duval D, Gourbal B. First characterization of viruses from freshwater snails of the genus *Biomphalaria*, the intermediate host of the parasite *Schistosoma mansoni*. *Acta Trop*. 2017;167:196-203.
3. Zeng X, Yiu WC, Cheung KH, Yip HY, Nong W, He P, Yuan D, Rollinson D, Qiu J, Fung MC, Wu Z, Hui JHL. Distribution and current infection status of *Biomphalaria straminea* in Hong Kong. *Parasit Vectors*. 2017;10:351.
4. Colley DG, Bustinduy AL, Secor WE, Rei CH. Human schistosomiasis. *Lancet*. 2014; 383:2253-64.
5. Carvalho OS, Mendonça CLF, Marcelino JMR, Passos LKJ, Fernandez MA, Leal RS, et al. Geographical distribution of intermediate hosts of *Schistosoma mansoni* in the states of Paraná, Minas Gerais, Bahia, Pernambuco and Rio Grande do Norte, Brazil, 2012-2014*. *Epidemiol Serv Saude*. 2018;27:e2017343.
6. 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 São Paulo*. 2018;60:e41.
7. Oliveira DS, Calasans TAS, Melo AGS, Melo CM, Madi RR, Jeraldo VLS. Reflex of urban space changes and climate conditions in *Biomphalaria glabrata* population dynamics on potential schistosomiasis foci in northeastern Brazil. *Scientia Plena*. 2016;12:8.
8. Silva PB, Barbosa CS, Pieri O, Travassos A, Florencio L. Physico-chemical and biological aspects related to the occurrence of *Biomphalaria glabrata* in foci of schistosomiasis in coastal areas of the State of Pernambuco, Brazil. *Qim nova*. 2006;29:901-906.
9. Pieri OS, Gonçalves JF, Sarquis O. Repeated focal mollusciciding for snail control in sugar-cane area of northeast Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1995;90 Suppl 1:535-536.
10. Freitas JR, Santos MBL. Técnicas malacológicas: Alimentação. In: Barbosa FS. Editor. *Tópicos em Malacologia Médica*. Rio de Janeiro: Fiocruz; 1995. p. 300-310.
11. Silva IP, Adorno, EV. Environmental and particle size parameters on Cabuçu and Bom Jesus dos Pobres beaches, in Recôncavo Bahiano, Brazil. *Estud Biol*. 2011;32:53-9.

12. Barbosa CS, Pieri OS, Silva CB, Barbosa FS. Eco epidemiology of urban schistosomiasis in Itamaracá Island, Pernambuco, Brazil. *Rev Saúde Pública*. 2000;34:337-41.
13. Brasil: Ministério da Saúde. Surveillance and Control of Mollusks with Epidemiological Importance: technical directives: Schistosomiasis Control and Surveillance Program. Brasília: Ministério da Saúde; 2008. p.111-116. <http://portalms.saude.gov.br/images/pdf/2015/agosto/14/vigilancia-controle-moluscos-import-epidemio-2ed>. Accessed 22 nov 2018.
14. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística: Aglomerados Subnormais Primeiros Resultados. Brasil Censo demográfico 2018. <https://www.ibge.gov.br>. Accessed 10 oct 2018.
15. Souza JAR, Moreira DA, Condé NM, Carvalho WB, Carvalho CVM. Análise das condições de potabilidade das águas de surgências em Ubá, MG. *Rev Ambient Água*. 2015;10:614-622.
16. Rice EW, Baird RB, Eaton AD, Clesceri LS. Standard methods for the examination of water and wastewater. Edited by American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) and Water Environment Federation (WEF), Washington, D.C.: USA; 2012. p. 350-392.
17. Silva FC. Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Rio de Janeiro: Embrapa Solos; 1999. p. 401.
18. Rice ME, Harris GT. Comparing effect sizes in follow-up studies: ROC Area, Cohen's d, and r. *Law Hum Behav*. 2005;29:615-20.
19. Unal I. Defining an Optimal Cut-Point Value in ROC Analysis: An Alternative Approach. *Math Meth Med*. 2017; 1-14.
20. Barbosa VS, Loyo RM, Guimarães RJPS, Barbosa CS. The Geographic Information System applied to study schistosomiasis in Pernambuco. *Rev Saude Publica*. 2017;51:107.
21. Gomes ECS, Leal-Neto OB, Albuquerque J, Silva HP, Barbosa CS. Schistosomiasis transmission and environmental change: a spatio-temporal analysis in Porto de Galinhas, Pernambuco–Brazil. *Int. J. Health Geogr*. 2012; 11: 51.
22. Calasans TAS, Souza GTR, Melo CM, Madi RR, Jeraldo VDLS. Socioenvironmental factors associated with *Schistosoma mansoni* infection and intermediate hosts in an urban area of northeastern Brazil. *PLoS ONE*. 2018;13: e0195519.
23. Oliveira DS, Santos VB, Melo AG, Lima AS, Carvalho CD, Allegretti SM, et al. Schistosomiasis mansoni in urban northeast Brazil: influence of rainfall regime

- on the population dynamics of *Biomphalaria* sp. Rev Soc Bras Med Trop. 2013; 46:654–657.
24. Rollemberg CVV, Santos CMB, Silva MMBL, Souza AMB, Silva AM, Almeida JA, et al. Epidemiological characteristics and geographical distribution of schistosomiasis and geohelminths, in the State of Sergipe, according to data from the Schistosomiasis Control Program in Sergipe. Rev Soc Bras Med Trop. 2011;44: 91-96.
 25. Giovanelli A, Soares MS, D'andréa PS, Gonçalves MML, Rey L. Abundância e infecção do molusco *Biomphalaria glabrata* pelo *Schistosoma mansoni* no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. Rev Saúde Pública. 2001;35:523-530.
 26. Leal-Neto OB, Gomes ECS, Oliveira-Junior FJM, Andrade R, Reis DL, Souza-Santos R, et al. Biological and environmental factors associated with 34 risk of schistosomiasis mansoni transmission in Porto de Galinhas, Pernambuco State, Brazil. Cad Saúde Pública. 2013;29:357–367.
 27. Gomes ECS, Mesquita MCS, Rehn VNC, Nascimento, WRC, LoyoI R, Barbosa CS. Urban transmission of schistosomiasis: new epidemiological situation in the forest area of Pernambuco. Rev Bras Epidemiol. 2016;19:822-834.
 28. Yang Y, Huang SY, Pei FQ, Chen Y, Jiang, QW, Deng, ZH, et al. Spatial distribution and habitat suitability of *Biomphalaria straminea*, intermediate host of *Schistosoma mansoni*, in Guangdong, China. Infect Dis Poverty. 2018;7:109.
 29. Opisa S, Odiere MR, Jura WG, Karanja DM, Mwinzi PN. Malacological survey and geographical distribution of vector snails for schistosomiasis within informal settlements of Kisumu City, western Kenya. Parasit Vectors. 2011; 4:226.
 30. Allan F, Sousa-Figueiredo J, Emery A, Paulo RE, Mirante C, Sebastião A, et al. Mapping freshwater snails in north-western Angola: distribution, identity and molecular diversity of medically important taxa. Parasit Vectors. 2017;10:460.
 31. Santos MAV, Brabo ES, Carneiro BS, Faial KF, Rodrigues IRC. Quantitative study of metal present in the hemolymph of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda), infected and uninfected with *Schistosoma mansoni*. Rev Soc Bras Med Trop. 2005;38:157-160.
 32. Teixeira RS, Lima EG, Santana JV, Cruz CF, Alcântara SRS, Schwarzelmüller H. Espacialização do Caramujo Da Espécie *Biomphalaria glabrata* do Córrego da Lagoa do Parque de Pituaçu Salvador – Ba. Candombá – Rev Virtual. 2011; 7:55-64.
 33. Silva, PB. Caracterização do ambiente físico-químico e biológico de *Biomphalaria glabrata* em focos litorâneos da esquistossomose em Pernambuco. <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/5700> (2018). Accessed em 10 Dec 2018.

Identificação das proteínas de moluscos *Biomphalaria glabrata* oriundos de área rural e praiana do nordeste brasileiro

Taíssa Alice S Calasans¹, Verónica de Lourdes S Jeraldo¹

Resumo

A identificação de proteínas envolvidas na participação de atividades celulares, respostas de estresse, função imune e regulação da expressão gênica podem explicar a forma de interação entre *Biomphalaria glabrata* e o ambiente. A espécie além de resistente ambientalmente, é a principal hospedeira intermediária do trematódeo *Schistosoma mansoni* que transmite a esquistossomose em seres humanos. Assim o objetivo desse estudo foi identificar e caracterizar as proteínas de populações distintas de *B. glabrata* coletados em área praiana e rural de Aracaju-Se no nordeste do Brasil. Foram identificadas proteínas caracterizadas por funções biológicas voltadas para possíveis contaminantes nos ambientes aquáticos. A identificação foi crucial e permite oportunidades na continuidade do estudo, em busca de desenvolver novas medidas para o controle da transmissão da esquistossomose.

Palavras- chave: *Biomphalaria glabrata* – ambiente – esquistossomose – proteômica.

Os moluscos da espécie *Biomphalaria glabrata* são importantes hospedeiros intermediários responsáveis por infectar os seres humanos ao liberar cercarias de *Schistosoma mansoni* no ambiente hídrico ^(1,2,3). No Brasil, o *S. mansoni* é o agente etiológico da esquistossomose mansônica que acomete 2,5 a 8 milhões de pessoas.

A presença de *B. glabrata* em coleções hídricas é preocupante, devido ao seu alto potencial biológico de infecção natural e vasta distribuição geográfica em ambientes rurais e urbanos, e ao longo da faixa costeira e áreas interioranas ^(4,5). A espécie habita principalmente lagos, poços e riachos ⁽⁶⁾ e pode colonizar grandes áreas, além de possuir boa tolerância a ambientes aquáticos com variações nas características físicas, químicas e biológicas, devido a sua boa capacidade de ocupar novos nichos ecológicos ^(7,3).

Desta forma, considerando o ambiente aquático, tem-se a espécie *B. glabrata* se mostrado como ótimo modelo animal resistente aos efeitos que as variações físico e químicas no ambiente ⁽⁸⁾, podem vir a causar em seu organismo. Espécies de *Biomphalaria* são capazes de manter sua integridade principalmente através da atividade de seu sistema de defesa interno, composto de componentes celulares ⁽⁹⁾ e solúveis.

Os Hemócitos, por exemplo, são a principal linha de defesa celular envolvida na destruição de helmintos em moluscos que servem como hospedeiro intermediário⁽⁸⁾, ocorrendo intensa interação entre os hemócitos e os fatores solúveis (proteínas plasmática) presentes na hemolinfa. Neste contexto, algumas proteínas são encontradas tanto nos hemócitos, quanto no plasma de *B. glabrata*, porém pouco se sabe sobre a complexidade proteica. No plasma já foi possível identificar proteínas relacionadas à homeostase de cálcio ⁽¹⁰⁾. Em um estudo realizado para avaliar as alterações fisiológicas em *B. glabrata* submetidas ao tratamento com extrato de planta, cujo seu princípio ativo contém uma molécula 1,25-diidroxicolecalciferol, que em excesso no organismo produz o aumento da concentração da proteína de ligação com cálcio, os moluscos tiveram suas proteínas totais alteradas devido à ação do extrato, porém, não se observou alteração no conteúdo de cálcio ⁽¹¹⁾.

Vários estudos são descritos na literatura com *B. glabrata* dentro da vertente do proteoma, principalmente voltado para compreensão do modelo *Biomphalaria glabrata*/*Schistosoma mansoni* e suscetibilidade à infecção de outros parasitas ^(12,13), e assim proporcionar suporte que possam servir para desenvolver estratégias de controle da esquistossomose. Proteínas são identificadas na tentativa de se compreender o papel que o sistema imunológico do molusco desempenha na relação com o parasita ⁽¹⁴⁾. No entanto, se faz necessário envolver a caracterização de proteínas e suas funções voltadas para o modelo *Biomphalaria glabrata*/ambiente, a fim de se entender melhor o comportamento de sobrevivência dessa espécie em diversificados ambientes, visto que se mostram importantes para a manutenção do ciclo do *S. mansoni*.

O estudo do Proteoma designa o conjunto de proteínas que estão sendo expressas por uma célula, tecido ou organismo em um determinado momento. De forma distinta, a análise proteômica consiste no estudo do proteoma utilizando técnicas de separação e identificação, caracterização das proteínas como também a disposição de suas modificações e isoformas, além de suas funções e possíveis interações com outras

proteínas ⁽¹⁵⁾. Este tipo de estudo envolve etapas como: extração e tratamento da amostra, separação das proteínas e/ou peptídeos, espectrometria de massas e análise dos dados usando ferramentas de bioinformática.

Nesse estudo, o objetivo foi identificar e caracterizar as proteínas de populações distintas de *B. glabrata* coletadas em área praiana e rural de Aracaju-Se, no nordeste do Brasil.

Assim, as espécies *B. glabrata* utilizadas nesse estudo, foram provenientes de criadouros encontrados em ambientes distintos localizados em área de praia e rural na cidade de Aracaju-Sergipe, Brasil. Os moluscos foram separados e nomeados em dois grupos: Grupo MP = Molusco Praia e Grupo MR = Molusco Rural, e para cada grupo 4 exemplares de *B. glabrata*. Posteriormente foram encaminhadas ao departamento de Biologia Animal da Universidade Estadual de Campinas, para realização da extração proteica. A extração foi realizada a partir dos tecidos do manto completo das espécies. Os mantos foram cortados e picotados sobre o gelo seco e submetidos ao tampão de extração em solução. Foi adicionada 300µL de tampão de Lise para inibição de protease (pH 8.1 contendo Uréia 8M, Tris 50mM).

As amostras foram homogeneizadas para rompimentos das células e liberação das proteínas utilizando um aparelho Politron de alta frequência e encaminhadas à centrifugação a 15.000g por 15min ajustado a temperatura de 4°C. O sobrenadante contendo as proteínas foi recuperado e armazenado a -80°C. A digestão com tripsina de proteínas para espectrometria de massas (LC-MS/MS) foi realizada utilizando procedimento previamente descrito por Vergote et al. (2005)⁽⁹⁾. Os dados obtidos na espectrometria de massas foram processados nos programas *MaxQuant* v1.3.0.3 para identificação das proteínas e submetidos a buscas de número de acessos no VectorBase, NCBI e Uniprot para o Gene Ontology (GO). No programa *Perseus* v1.2.7.4 realizado Student's *t*-test para diferenças significativas na intensidade das proteínas entre os grupos estudados, com nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$) e a ferramenta online Clustvis para visualizar o clustering dos dados⁽¹⁵⁾.

De um total de 698 proteínas quantificadas, 189 foram identificadas e 8 delas mostraram diferença estatisticamente significativa (Student's t-teste, $p < 0,05$) com expressão modulada entre os moluscos da praia (MP) e rural (MR) (Figura A). As 8 proteínas aumentadas e reduzidas, estavam com maior expressão no grupo MP e com menor expressão no grupo MR (Figura B) e na figura C os grupos se mostraram associados entre si.

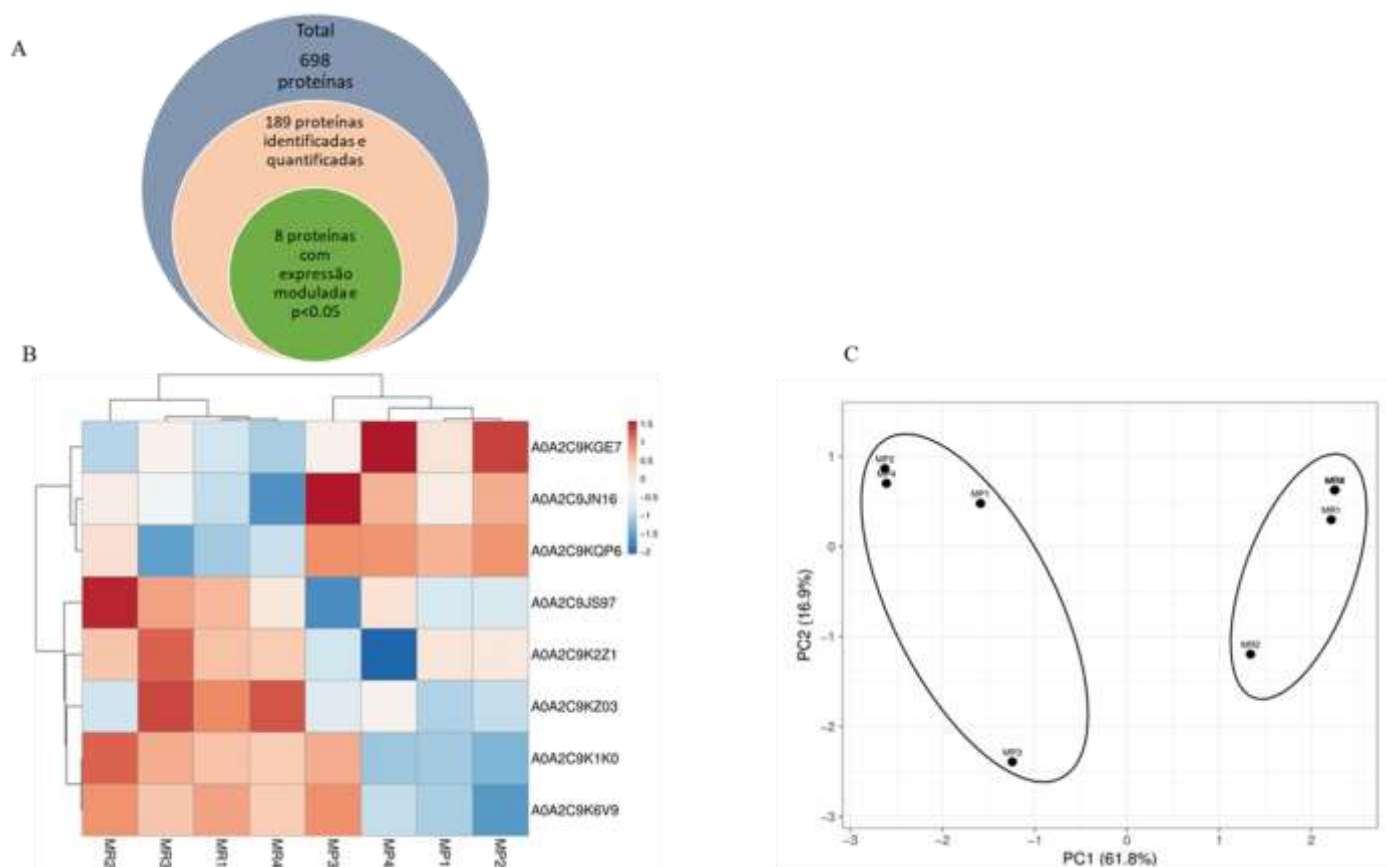


Figura 1. (A) Diagrama de Venn evidenciando o número de proteínas identificadas e quantificadas. (B) Heatmap das proteínas detectadas aumentadas e reduzidas de dois grupos de moluscos coletados em ambientes diferentes onde MP – Moluscos da praia (ambiente salino de Aracaju-Se, Brasil); MR- Moluscos Rural (ambiente não salino de Aracaju-Se,Brasil).(C) PCA-Análise de Componentes Principais - A escala de variação de unidade é aplicada às linhas; calculando os componentes principais. Moluscos do grupo MP e MR se apresentaram diferentes.

A tabela 1 apresenta os códigos de acesso encontrados em três bases de dados (vector base, Uniprot e NCBI), para descrever as proteínas identificadas. O organismo

B. glabrata, no qual as proteínas foram identificadas como: peptidyl-prolyl cis-trans isomerase H-like, hydroxyphenylpyruvate dioxygenase-like, 3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial-like, D-dopachrome decarboxylase-like/transcript variant X1, aconitate hydratase, mitochondrial-like, Haemoglobin type 2 transcript variant X1, 3-hydroxybutyrate dehydrogenase type 2-like, transcript variant X2. Os acessos aos domínios estão na figura S2, são as regiões da cadeia polipeptídica que formam as unidades globulares ⁽¹⁶⁾, no que se refere, a formação de uma estrutura compacta e estável da proteína com determinadas funções.

Ao realizar uma comparação da descrição das proteínas em conjunto nas bases de dados Uniprot e NCBI por meio dos números de acessos, os resultados adquiridos mostram a necessidade de se realizar a busca em várias bases, após quantificação proteica. Pois em alguns acessos no Uniprot não foi possível encontrar a descrição das proteínas, no entanto, no NCBI foi possível encontrar todas as descrições (Tabela II). Ressalta-se que não houve divergência de resultados das descrições presentes nas duas bases de dados.

Os resultados obtidos na busca do GO para obter informações celulares, função molecular e processos biológicos das proteínas descritas, estavam incompletos no Uniprot, como por exemplo, a obtenção de uma única identificação do componente celular para a proteína do acesso A0A2C9K6V9 (Tabela II). O GO indicou que essa proteína desempenha papel na mitocôndria com função molecular de aglomeração de ferro-enxofre e ligação de íons de metal. O GO mostrou que a proteína A0A2C9JS97 também desempenha função molecular de ligação de íons de metal, porém com processo biológico de redução de oxidação. As proteínas dos acessos A0A2C9KGE7/Q14SM7 e A0A2C9KZ03 foram identificadas e são registradas com suas funções moleculares para ligação de oxigênio e processo de redução de oxidação, mas com processos biológicos desconhecidos (Tabela II).

TABELA I
Proteínas identificadas e códigos de acesso

Access /VectorBase	Access/Uniprot	Access/NCBI	Description	Unique Peptides	MW(kDa) calculated/observed
BGLB005053	A0A2C9JN16	XM_013218525.1	PREDICTED: Biomphalaria glabrata peptidyl-prolyl cis-trans isomerase H-like (LOC106060591), mRNA	6	24.64
BGLB007216	A0A2C9JS97	XP_013080331.1	PREDICTED: 4- Biomphalaria glabrata-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase-like [	7	43.516
BGLB011665	A0A2C9K1K0	XM_013238646.1	PREDICTED: Biomphalaria glabrata 3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial-like (LOC106077935), mRNA	4	38.008
BGLB005683	A0A2C9K2Z1	XM_013220253.1	PREDICTED: Biomphalaria glabrata D-dopachrome decarboxylase-like (LOC106061999), transcript variant X1, mRNA	3	10.585
BGLB014203	A0A2C9K6V9	XM_013209062.1	PREDICTED: Biomphalaria glabrata aconitate hydratase, mitochondrial-like (LOC106053501), mRNA	4	84.883
BGLB019194	A0A2C9KGE7/Q14SM7	XM_013206929.1/CAJ44467.1	PREDICTED: Biomphalaria glabrata/ Haemoglobin type 2 (LOC106051722), mRNA	15	88.413
BGLB022463	A0A2C9KQP6	XM_013234828.1	PREDICTED: Biomphalaria glabrata, transcript variant X1, (LOC106074105) mRNA	3	14.65
BGLB025182	A0A2C9KZ03	XM_013237539.1	PREDICTED: Biomphalaria glabrata 3-hydroxybutyrate dehydrogenase type 2-like (LOC106076718), transcript variant X2, mRNA	4	26.484

Descrição das proteínas identificadas no software MaxQuant e seus respectivos códigos de acesso em diferentes base de dados.

TABELA II
Gene ontology (GO)

Uniprot N°Access	Description	NCBI N° Access	Description	Cellular component	Molecular function	Biological process
A0A2C9JN16	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	XM_013218525.1	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase H-like (LOC106060591), mRNA	*	isomerase activity (GO:0003755)	*
A0A2C9JS97	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	XM_013224877.1	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase-like (LOC106065939), mRNA	*	activity/metal ion binding (GO:0003868/GO:004 6872)	aromatic amino acid family metabolic process/oxidation- reduction process (GO:0009072/GO:005 5114)
A0A2C9K1K0	unknown	XM_013238646.1	ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial-like (LOC106077935), mRNA	*	catalytic activity/transferase activity (GO:0003824/GO:001 6740)	*
A0A2C9K2Z1	unknown	XM_013220253.1	D-dopachrome decarboxylase- like (LOC106061999), transcript variant X1, mRNA	*	*	*
A0A2C9K6V9	Aconitate hydratase, mitochondrial	XM_013209062.1	aconitate hydratase, mitochondrial-like (LOC106053501), mRNA	Mitochondrion (GO:0005739)	4 iron, 4 sulfur cluster binding/aconitate hydratase activity/ metal ion binding (GO:0051539/GO:000 3994/GO:0046872)	aconitate hydratase activity/lyase activity/metal ion binding/iron-sulfur cluster binding (GO:0003994/GO:001 6829/GO:0046872/GO :0051536)

TABELA II
Gene ontology (GO)

A0A2C9KGE7/ Q14SM7	Haemoglobin type 2	XM_013206929.1/ CAJ44467.1	Haemoglobin type 2	*	oxygen binding/heme binding (GO:0019825/GO:002 0037)	*
A0A2C9KQP6	unknown	XM_013234828.1	transcript variant X1, mRNA	*	*	*
A0A2C9KZ03	unknown	XM_013237539.1	3-hydroxybutyrate dehydrogenase type 2-like (LOC106076718), transcript variant X2, mRNA	*	oxidoreductase activity/oxidation- reduction process (GO:0016491/GO:005 5114)	*

Gene ontology (GO) do banco de dados do UniProt (<https://www.uniprot.org/>) para componentes celulares, função molecular e processos biológicos de proteínas de *Biomphalaria glabrata*. (* indica que não há anotação GO).

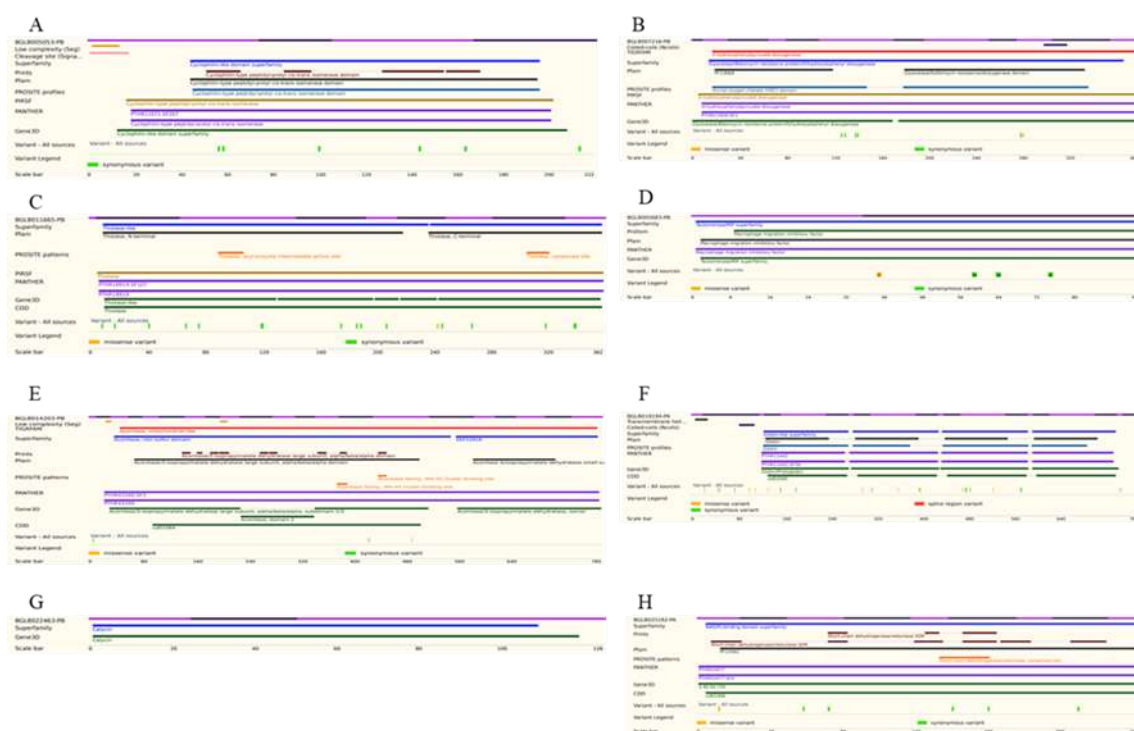


Figura S2. Números de acesso para os domínios das proteínas do banco de dados VectorBase (<https://www.vectorbase.org>) (A)BGLB005053-PB; (B) BGLB007216-PB; (C)BGLB011665-PB; (D) BGLB005683-PB; (E)BGLB014203-PB; (F) BGLB019194-PA, (G) BGLB022463-PB; (H)BGLB025182-PA.

A utilização de ferramentas de Biologia Molecular e Bioinformática no estudo proteômico com a espécie *B. glabrata*, é relevante na obtenção da compreensão frente ao seu comportamento de sobrevivência em diferentes ambientes hídricos. Neste estudo foram coletados moluscos em coleções hídricas de cunho praiano e rural. Os resultados de expressão modulada das proteínas nos grupos de moluscos evidenciaram maior expressão no grupo MP, (proteínas mais espessas), e menor expressão no grupo MR, sendo assim menos espessas. Essa diferença pode estar relacionada a fatores ambientais físico, químicos ou biológicos presentes nesses criadouros. Visto que, os ecossistemas aquáticos passam por crescente processo de contaminação procedente de atividades industriais, agrícolas e urbanas, acarretando efeitos adversos nos organismos vivos presentes nesses ambientes ⁽¹⁷⁾.

A espécie estudada nesse trabalho é destacada por outros autores por sua forte resistência aos ambientes com elevados parâmetros físicos, químicos, dentre eles a salinidade ^(18,19). O que ressalta a relevância do grupo MP coletados em criadouro de praia, ambiente este que pode estar assumindo um parâmetro salino e proporcionado às

expressões aumentadas nas proteínas identificadas. Porém seria necessário um estudo mais preciso com a mensuração dos parâmetros físico-químicos nos criadouros. Assim contribuir para um melhor entendimento em nível molecular referente à resposta ao estresse salino em *B. glabrata*, de como o sistema imune se comporta.

Dentro desse contexto, está à identificação de proteínas com atividade funcional para ligação de íons de metal, ligação de oxigênio e processo biológico de redução de oxidação. A hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD) é uma proteína de oxidação que pode ser indicadora da presença de agroquímicos no ambiente, sendo de grande interesse no estudo de novos herbicidas, pois segundo ⁽²⁰⁾ essa proteína possui inibidores que evitam o acúmulo de subprodutos metabólicos tóxicos em organismos. O molusco *B. glabrata* tem sido utilizado como bioindicador em alguns estudos das funções biológicas de sobrevivência e reprodução frente a agentes estressores em aplicações ambientais ⁽²¹⁾. Ansaldo e colaboradores (2009) ressaltam a importância dessa espécie como bioindicador de contaminação por metais em ambientes hídricos ⁽²²⁾.

As proteínas do conjunto metalotioneínas (MTs) identificadas nas *Biomphalaria* dos grupos MP e MR, são proteínas de estabilidade ao calor que possuem alta afinidade por íons metálicos e desoxidação de metais tanto essenciais quanto não essenciais ⁽²³⁾. Uma função biológica de destaque dessas proteínas segundo Viarengo et al (2007) ⁽²³⁾ é a homeostase, que se configura na condição de relativa estabilidade da qual o organismo necessita para realizar suas funções adequadamente para o equilíbrio do corpo interno. Função esta não esclarecida nas pesquisas realizadas no Uniprot, fator este que prejudica melhores esclarecimentos a respeito de proteínas relacionadas ao gênero *Biomphalaria*.

As metalproteínas são biomarcadores específicos de exposição à contaminação por metais e consequentemente sua produção é induzida pelo aumento da entrada desses metais na célula ⁽²³⁾. Assim, igualmente, aos resultados expostos nesse trabalho, essas proteínas já foram identificadas em tecidos de invertebrados aquáticos ⁽²⁴⁾. Cabe ressaltar em atenção as *Biomphalaria* do grupo MP, em que a Salinidade é um fator natural que pode afetar a especiação e biodisponibilidade dos metais, a ponto de influenciar a expressão de MTs ⁽¹⁷⁾, corroborando com os resultados de proteínas mais expressas nesse grupo do criadouro da praia.

A identificação de proteínas envolvidas na participação de atividades celulares, respostas de estresse, função imune e regulação da expressão gênica podem explicar a forma de interação entre o modelo *B. glabrata*/ambiente⁽²⁵⁾. Cuja espécie é a principal hospedeira do agente etiológico, causador da esquistossomose mansônica nos seres humanos⁽²⁶⁾.

A identificação de proteínas em *B. glabrata* é fundamental a fim de se compreender a atividade de seu sistema de defesa interno frente à sobrevivência da espécie em ambientes diversificados. Os resultados desse trabalho evidenciaram a identificação de proteínas caracterizadas por funções biológicas voltadas para possíveis contaminantes nos ambientes aquáticos. Essa identificação é crucial e permite oportunidades na continuidade do estudo, em busca de se tentar desenvolver novas medidas para o controle da transmissão da esquistossomose, mediada por essa espécie.

Referências

1. Dinguiard N, Cavalcanti MGS, Wu X-J, Bickham-Wright U, Sabat G, Yoshino TP. Proteomic Analysis of *Biomphalaria glabrata* Hemocytes During in vitro Encapsulation of *Schistosoma mansoni* Sporocysts. *Front Immunol.* 2018; 9 (2773): 1-17.
2. Fneich S, Dheilly N, Adema C, Rognon A, Reichelt M, Bulla J, Grunau C, Cosseau C. 5-methyl-cytosine and 5-hydroxymethyl-cytosine in the genome of *Biomphalaria glabrata*, a snail intermediate host of *Schistosoma mansoni*. *Parasites & Vectors.* 2013; 6 (167) 1-11.
3. Silva KER, Silva RMF, Costa, SPM, Rolim, LA, Lima, MCA, Rolim-Neto, PJ. Alternativas terapêuticas no combate à Esquistossomose Mansônica. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.* 2012; 33 (1):9-16.
4. Barbosa VS, Loyo RM, Guimarães RJPS, Barbosa CS. The Geographic Information System applied to study schistosomiasis in Pernambuco. *Rev Saude Publica.* 2017; 51 (107): 1-10.
5. Oliveira DSOS, Calasans TAS, Melo AGS, Melo CM, Madi RR, Jeraldo VLS. Reflex of urban space changes and climate conditions in *Biomphalaria glabrata* population dynamics on potential schistosomiasis foci in northeastern Brazil. *Scientia Plena.* 2016; 12 (8): 1-10.

6. Guimarães RJPS, Freitas CC, Dutra LV, Felgueiras CA, Moura ACM, Amaral RS, Carvalho, OS. Spatial distribution of *Biomphalaria* mollusks at São Francisco River Basin, Minas Gerais, Brazil, using geostatistical procedures. *Acta tropica*. 2009; 109 (3): 181-186.
7. Silva LRS, Silva EB, Amaral AJ, Amâncio FF, Melo AMMA. Evaluation of radiosensitivity hemocytes of *Biomphalaria glabrata* exposed to gamma radiation. *Scientia Plena*. 2013; 9 (5): 1-6.
8. Barçante TA, Barça JM, Fujiwara RT, Lima WS. Análise de Hemócitos Circulantes de *Biomphalaria glabrata* após Infecção por *Angiostrongylus vasorum* Usando Citometria de Fluxo. *J Parasitol Res*. 2012; 314723.
9. Vergote D, Bouchut A, Sautière PE, Roger E, Galinier R, Rognon A, Mitta G. Characterization of proteins differentially present in the plasma of *Biomphalaria glabrata* susceptible or resistant to *Echinostoma caproni*. *International Journal for Parasitology*. 2005; 35 (2): 215-224.
10. Mello-Silva CC, Lima M, Pinheiro J, Bezerra JCB, Rodrigues MLA. Physiological changes of *Biomphalaria glabrata* treated with *Solanum malacoxylon* crude extract. *Ciência Animal*. 2006; 16 (2): 61-70.
11. Galinier R, Portela J, Moné Y, Allienne JF, Henri H, Delbecq S, Duval D. Biomphalysin, a New β Pore- forming Toxin Involved in *Biomphalaria glabrata* Immune Defense against *Schistosoma mansoni*. *PLOS Pathogens*. 2013; 9 (3).
12. Bouchut A, Sautiere PE, Coustau C, Mitta G. Compatibility in the *Biomphalaria glabrata*/*Echinostoma caproni* model: Potential involvement of proteins from hemocytes revealed by a proteomic approach. *Acta Tropica*. 2006; 98 (3): 234-246.
13. Wu X-J, Dinguirard N, Sabat G, Lui H, Gonzalez L, Gehring M, Yoshino TP. Proteomic analysis of *Biomphalaria glabrata* plasma proteins with binding affinity to those expressed by early developing larval *Schistosoma mansoni*. *PLOS Pathogens*. 2017; 13 (5): 1-30.
14. Zhang Y, Fonslow BR, Shan B, Baek MC, Yates JR. Protein analysis by Shotgun/Bottom-up Proteomics. *Chemical Reviews*. 2013; 113 (4): 2343-2394.

15. Metsalu T, Vilo J. ClustVis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap. *Nucleic Acids Research*. 2015; 43 (1): 566-570.
16. Shoshana JW, Janin J. Location of structural domains in proteins. *Biochemistry*. 1981; 20 (23): 6544-6552.
17. Freire MM, Santos VG, Ginuino ISF, Arias AR. Biomarcadores na avaliação da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos. *Oecol Bras*. 2008; 12 (3): 347-354.
18. Silva PB, Barbosa CS, Pieri O, Travassos A, Florencio L. Physico-chemical and biological aspects related to the occurrence of *Biomphalaria glabrata* in foci of schistosomiasis in coastal areas of the State of Pernambuco, Brazil. *Quimica Nova*. 2006; 29 (5): 901-906.
19. Souza MAA, Barbosa VS, Guedes TN, Barbosa CS. Temporary and permanent breeding sites for *Biomphalaria* in Jaboatão dos Guararapes, PE. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008; 41 (3): 252-256.
20. Brownlee JM, Johnson-Winters K, Harrison DHT, Moran GR. Structure of the Ferrous Form of (4-Hydroxyphenyl) pyruvate Dioxygenase from *Streptomyces avermitilis* in Complex with the Therapeutic Herbicide. *Biochemistry*. 2004; 43 (21): 6370-6377.
21. Ansaldo M, Nahabedian DE, Holmes-Brown E, Agote M, Ansay CV, Guerrero NRV, Wider EA. Potential use of glycogen level as biomarker of chemical stress in *Biomphalaria glabrata*. *Toxicology*. 2006; 224 (1-2): 119-127.
22. Ansaldo M, Nahabedian DE, Di Fonzo C, Wider EA. Effect of cadmium, lead and arsenic on the oviposition, hatching and embryonic survival of *Biomphalaria glabrata*. *Sci Total Environ*. 2009; 407 (6): 1923-1928.
23. Viarengo A, Lowe D, Bolognesi C, Fabbri E, Koehler A. The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology part C. Toxicology & Pharmacology*. 2007; 146 (3): 281-300.
24. Sarkar A, Ray D, Shrivastava AN, Sarker S. Molecular Biomarkers: Their significance and application in marine pollution monitoring. *Ecotoxicology*. 2006; 15 (4): 333-340.
25. Adema CM, et al. Whole genome analysis of a schistosomiasis-transmitting freshwater snail. *Nature Communications*. 2017; 8 (15451): 1-11.

26. Calasans TAS, Souza GTR, Melo CM, Madi RR, Jeraldo VDLS. Socioenvironmental factors associated with *Schistosoma mansoni* infection and intermediate hosts in an urban area of northeastern Brazil. PLoS ONE. 2018, 13(5).

8 CONCLUSÃO GERAL

O presente estudo constatou em seus resultados a presença da espécie *B. glabrata* infectada por *S. mansoni*, habitando coleções hídricas praianas e rurais. Bem como características físico-químicas dos ambientes favoráveis a sua distribuição e sobrevivência. A identificação de criadouros do molusco juntamente com a avaliação dos seus aspectos ecológicos e biológicos foi relevante para se compreender o grau de relação entre esses aspectos e a sobrevivência dos moluscos nas localidades. Os resultados das análises realizadas mostraram que a espécie é bastante tolerante a variabilidade dos fatores físico-químicos, possuindo total capacidade de colonizar uma grande variedade de corpos d'água, aumentando as possibilidades de expansão da esquistossomose. O que seguramente se torna difícil realizar, qualquer medida de controle ambiental do molusco baseada exclusivamente na manipulação de dados ambientais. Neste sentido este trabalho iniciou um estudo do proteoma da espécie *B. glabrata*, no qual foram extraídas e identificadas proteínas caracterizadas segundo a base de dados, com funções biológicas de ligação a contaminantes ambientais. Concluímos que ainda é necessário intensificar os estudos proteômicos na vertente dos hospedeiros intermediários frente a aspectos ambientais. E gerar novas medidas para o controle da transmissão da esquistossomose, e, possivelmente, recomendar aos órgãos de vigilância em saúde ambiental maior atenção nas localidades.

