

TÉCNICAS BIOMOLECULARES APLICADAS EM HOSPEDEIROS INTERMEDIÁRIOS DA ESQUISTOSSOMOSE

(Biomolecular techniques applied to intermediate hosts of Schistosomiasis)

Jalison figueredo do RÊGO*; Ivete Lopes de MENDONÇA

¹Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí. Campus do Socopo, Teresina/PI. CEP: 64.049-550. *E-mail: jalisonreg@yahoo.com.br

RESUMO

A esquistossomose é uma doença parasitária acometida por milhões de pessoas no mundo. Essa parasitose é transmitida por caramujos que servem de hospedeiros intermediários de helmintos digenéticos. A identificação correta das espécies transmissoras pode auxiliar no conhecimento epidemiológico da doença. Contudo, métodos convencionais de classificação podem ter resultado duvidoso, devido à variação intraespecífica entre os espécimes. Em virtude disso, esta revisão teve como objetivo descrever as principais técnicas moleculares que podem ser aplicadas, assim como o aprimoramento dos métodos ao longo do tempo. A PCR é uma técnica desenvolvida através da polimerização de DNA em cadeia realizada *in vitro*, onde se amplifica o DNA em múltiplas cópias, por replicação enzimática, sem necessidade de um organismo vivo. Na PCR, em tempo real, as fases de amplificação, detecção e quantificação são totalmente automatizadas, ocorrendo em simultâneo. Com a evolução da técnica convencional, foi surgindo a Proteína C Reativa – Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição (PCR-RFLP), os microssatélites, e a PCR-RAPD. Através dessas variantes foi possível classificar, com precisão, as espécies transmissoras, fazer as análises da variabilidade genética intraespecífica e ampliar os estudos filogenéticos das populações. O conhecimento da aplicação de técnicas moleculares pode auxiliar em pesquisas relacionadas à epidemiologia e ao controle populacional dos vetores transmissores da esquistossomose mansônica.

Palavras-chave: *Biomphalaria*, caramujos, polimerase.

ABSTRACT

Schistosomiasis is a parasitic disease that affects millions of people worldwide. This parasitosis is transmitted by snails that serve as intermediate hosts for digenetic helminths. The correct identification of the transmitting species can help in the epidemiological knowledge of the disease. However, conventional methods of classification may present questionable results due to intraspecific variation between specimens. As a result, this review aimed to describe the main molecular techniques that can be applied, as well as describe the improvement of the methods over time. PCR is a technique developed through the polymerization of DNA strands carried out in vitro, where it amplifies the DNA in multiple copies by enzymatic replication, without needing a living organism. In real-time PCR, amplification, detection and quantification phases are fully automated, occurring simultaneously. The evolution of the conventional technique resulted in the advent of Protein C Reactive - Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP), microsatellites, and Protein C Reactive – Random Amplification of Polymorphic DNA (PCR-RAPD). Through these variants it was possible to accurately classify the transmitting species, perform the analysis of intraspecific genetic variability and expand the phylogenetic studies of the populations. Knowledge of the application of molecular techniques can assist in research related to the epidemiology and population control of these vectors that transmit schistosomiasis mansoni.

Keywords: *Biomphalaria*, snails, polymerase.

INTRODUÇÃO

Estima-se que entre 150 e 200 milhões de pessoas podem ser infectadas pela esquistossomose em algum estágio de desenvolvimento (WHO, 2016), sendo que

Recebido: jan./2022.

Publicado: jun./2022.

aproximadamente 280 mil indivíduos morrem por ano com essa doença (STEINMANN *et al.*, 2006).

Essa parasitose é causada por trematódeos digenéticos do gênero *Schistosoma* spp., entretanto, somente algumas espécies são responsáveis pela enfermidade no mundo, sendo elas: *Schistosoma haematobium*, *S. intercalatum*, *S. japonicum*, *S. mansoni* e *S. mekongi* (COLLEY *et al.*, 2014). Cada uma dessas espécies tem uma gama específica de hospedeiros intermediários, dentre eles os caramujos do gênero *Biomphalaria*.

O estudo desses hospedeiros é importante para a interpretação de seus papéis na transmissão da esquistossomose e, sendo assim, para a orientação de medidas de controle adequadas a cada região e direcionadas aos caramujos. Conhecer detalhadamente as espécies a nível taxonômico permite o correto registro desses moluscos em uma determinada localidade e a detecção de possíveis áreas de transmissão da esquistossomose (TEODORO *et al.*, 2011).

As espécies tradicionalmente são identificadas utilizando métodos de análise da morfologia externa e/ou interna dos espécimes. Técnica que, em algumas ocasiões, torna o resultado duvidoso, quando ocorre grande variação intraespecífica nas características dos espécimes estudados (VIDIGAL *et al.*, 2000a). A fixação inadequada e o tamanho reduzido da concha também podem dificultar o resultado de identificação quando se utiliza o procedimento morfológico (CARVALHO *et al.*, 2008; CALDEIRA *et al.*, 2009). Outra consideração a se fazer é quanto à semelhança de algumas espécies, da qual surgiu a necessidade de agrupar algumas em complexos (CARVALHO *et al.*, 2008).

Em virtude da expressiva variação biológica e morfológica que o gênero *Biomphalaria* pode apresentar, fez-se necessária a utilização de técnicas auxiliares para identificação e estudos de variabilidade genética (TEODORO *et al.*, 2011). Desse modo, objetiva-se com este trabalho apresentar uma revisão das principais técnicas de biologia molecular utilizadas em hospedeiros intermediários da esquistossomose, enfatizando suas características e contribuições que podem auxiliar nas pesquisas taxonômicas.

DESENVOLVIMENTO

Caracterização da técnica do PCR

A técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction* – Reação em Cadeia da Polimerase) é desenvolvida através da polimerização de DNA em cadeia realizada *in vitro*, a qual consiste em um método de amplificação, isso é, criação de múltiplas cópias de DNA, por replicação enzimática, sem necessidade de um organismo vivo. Ou seja, é um processo através do qual o DNA poderia ser multiplicado artificialmente por meio de ciclos repetidos de temperatura, cuja reação seria catalisada pelo DNA polimerase. Essa técnica utiliza dois oligonucleotídeos iniciadores, que hibridizam com cadeias opostas e flanqueiam a sequência de DNA a ser amplificada (MOLINA e TOBO, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2007). No fim de um ciclo de PCR, obtêm-se duas novas cadeias de DNA para cada alvo da dupla cadeia. Assim, duas novas cadeias são sintetizadas a partir da cadeia molde em cada ciclo completo da técnica de PCR, fazendo com que ocorra um crescimento exponencial, e, assim, havendo ao fim de n ciclos 2n vezes mais cópias do que havia no início (DELIDOW *et al.*, 1993).

Posteriormente, ocorreu a evolução dessa análise molecular, com o surgimento da PCR em tempo real ou simplesmente qPCR. Essa nova técnica permite detectar o aumento da fluorescência durante a reação, devido à ligação do brometo de etídio às moléculas de DNA de dupla cadeia recém-sintetizadas (HIGUCHI *et al.*, 1993). Nesse método, as fases de amplificação, detecção e quantificação são totalmente automatizadas, ocorrendo em simultâneo e em tempo real (HEID *et al.*, 1996). Os compostos fluorescentes adicionados ao DNA geram um sinal de fluorescência, diretamente proporcional à quantidade de produto amplificado ao longo das diferentes fases. A fase de crescimento exponencial é considerada a melhor para se estudar a reação, devido à elevada eficiência registrada, uma vez que a relação entre a quantidade de produto e do input de DNA é mais consistente. Por esse motivo, os dados de fluorescência são geralmente recolhidos desde o início do processo de amplificação (KUBISTA *et al.*, 2006).

Aplicação da PCR em caramujos do gênero *Biomphalaria*

Nos primeiros estudos realizados em caramujos do gênero *Biomphalaria*, testou-se uma técnica de baixa adstringência da reação em cadeia da polimerase (PCR-LS), que permitiu a diferenciação de *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*. Contudo, a *B. straminea* mostrou perfis diferentes entre as populações (VIDIGAL *et al.*, 1996). Mais tarde, a PCR-LS seria utilizada para identificar *B. tenagophila* e *B. occidentalis*, mas os perfis gerados eram muito complexos, além da presença de outros perfis, o que dificultava a identificação (CALDEIRA *et al.*, 2009).

Surgimento da PCR-RFLP

As dificuldades observadas na PCR-LS permitiram que fosse desenvolvida a PCR-RFLP (PCR *Restriction fragment length polymorphism* - Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição). Esse é um método que utiliza enzimas de restrição para detecção de mutações e polimorfismos genéticos (VAS, 1992). As enzimas de restrição reconhecem sítios específicos na sequência do DNA, que é clivada somente quando o sítio está presente, gerando fragmentos de vários tamanhos, que são separados e analisados por eletroforese.

Originalmente, esse método foi utilizado no *Southern Blot* para detecção de grandes fragmentos de DNA. Nessa aplicação, o DNA genômico é fragmentado utilizando-se enzimas de restrição, e os fragmentos são separados por eletroforese em gel de agarose de alta resolução. Mais tarde, com a técnica aperfeiçoada, foi possível analisar fragmentos de tamanhos menores (SHI, 2001). Os fragmentos hibridizados são identificados por autorradiografia ou outro sistema de detecção. Com a inovação, os fragmentos são separados por eletroforese em gel de agarose ou acrilamida e detectados diretamente pela coloração com brometo de etídeo ou outro corante fluorescente (CHEN e VIOLA, 1991).

Essa técnica foi utilizada, com sucesso, na identificação das espécies brasileiras do gênero *Biomphalaria* (Vidigal *et al.*, 2000a), em que se utilizou região espaçadora transcrita (ITS), através do uso inicial da enzima de restrição DdeI (CALDEIRA *et al.*, 2009). Nesse estudo, os autores amplificaram a região espaçadora interna do gene do rRNA, constituído de três regiões conservadas 18, 5.8 e 28S, além de duas regiões espaçadoras (ITS1 E ITS2). Em uma pesquisa, na qual utilizaram o PCR-RFLP com sete enzimas de restrição diferentes, foi

observado que esta técnica identifica e diferencia as espécies de *Biomphalaria* que fazem parte do complexo *Tenagophila* (*B.t. guaibensis*, *B.t. tenagophila* e *B. occidentalis*), sendo que *B.t. tenagophila* apresenta perfil mais heterogêneo, mostrando algumas bandas polimórficas quando comparadas a populações do Brasil e da Argentina (SPATZ *et al.*, 1999). Os perfis obtidos com as mesmas sete enzimas estimaram a similaridade entre essas espécies, sugerindo, através da análise do agrupamento, que *B.t. guaibensis* é mais intimamente relacionada à *B. occidentalis* do que com *B.t. tenagophila*, indicando que *B.t. guaibensis* e *B. occidentalis* podem ser consideradas como táxons irmãos (SPATZ *et al.*, 1999).

No primeiro relato de *B. glabrata*, no Rio Grande do Sul, foram identificados, na mesma localidade dessa espécie, as espécies *B. occidentalis* e *B. t. guaibensis* (CARVALHO *et al.*, 1998), demonstrando que podem compartilhar os mesmos habitats, sem haver competição entre si. Com isso, destaca-se a importância da identificação molecular de moluscos *Biomphalaria*, pois, através da técnica de PCR-RFLP, foi possível identificar o perfil específico de *B. t. guaibensis*, com padrão de bandas muito diferente do observado em *B. glabrata* (VIDIGAL *et al.*, 2000b), permitindo afirmar, com certeza, a espécie identificada.

Em um estudo, onde se utilizou a PCR-RFLP para diferenciar as espécies do complexo *B. straminea* e estimar a distância genética entre elas, percebeu-se que *B. intermedia* é mais relacionada com *B. straminea* e *B. kuhniana* do que com *B. peregrina* (CALDEIRA *et al.*, 1998). Pesquisa semelhante foi desenvolvida para as espécies *B. oligoza*, *B. orbignyi* e *B. peregrina*, originárias de diferentes localidades da Argentina, do Brasil e do Uruguai (SPATZ *et al.*, 2000), obtendo excelentes resultados na diferenciação e identificação das espécies.

Em trabalhos de campo, é comum encontrar apenas a concha dos moluscos do gênero *Biomphalaria* spp., sem as partes moles, o que impossibilita a identificação e a detecção do *S. mansoni*. Além disso, encontram-se depositadas, em coleções malacológicas, diversas conchas que apresentam classificação duvidosa ou imprecisa. Para solucionar essas questões, foi desenvolvida uma estratégia para extração de vestígios do corpo do molusco existentes no interior de conchas vazias.

Pesquisadores fazendo análises em uma quantidade significativa de indivíduos obtiveram sucesso na identificação de moluscos do gênero *Biomphalaria* spp., a partir de DNA extraído de traços de matéria orgânica de conchas depositadas em coleções malacológicas por até dez anos (CALDEIRA *et al.*, 2004). Utilizou-se, como padrão de comparação, o DNA extraído das respectivas partes moles desses moluscos, armazenados a -20°C desde 1992. O DNA obtido da concha e do padrão de comparação foi submetido à técnica PCR-RFLP. Dessa forma, pôde-se observar os perfis específicos de *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea* (CALDEIRA *et al.*, 2009). Contudo, essa técnica não teve bons resultados em estudos populacionais e filogenéticos. Sua limitação está relacionada à falta de detecção de variação genética entre indivíduos da mesma espécie e de padrões fenotípicos nas bandas de gel entre espécies diferentes (PAVAN e MONTEIRO, 2014).

Microssatélites (SSR) e suas aplicações

A PCR, então, passou por mais uma variação, fazendo surgir a SSR-PCR (microssatélites) ou Repetições de Sequência Simples. Essa técnica foi muito utilizada para estudar variabilidade genética de *B. straminea*, *B. intermedia* e *B. kuhniana*, espécies que per-

tencem ao complexo *B. straminea*. Foi observado que os indivíduos mais relacionados pertencem à mesma espécie e localidade, e os indivíduos de diferentes localidades, porém de mesma espécie, apresentaram clara heterogeneidade. Usando o método de distâncias UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages*), para construir árvores filogenéticas, obtiveram-se excelentes resultados, indicando que a técnica é muito eficiente para estudos intraespecífico e intrapopulacional do complexo *B. straminea* (CALDEIRA *et al.*, 2001).

Os microssatélites são sequências curtas de DNA, contendo no máximo repetições de 6 pb e comprimento total geralmente não excedendo a 200pb. Regiões contendo SSRs são amplificadas através da PCR utilizando-se um par de iniciadores específicos que flanqueiam o microssatélite (CALDEIRA *et al.*, 2002). São loci altamente polimórficos, que podem ser usados para estudos de estruturas de populações e características evolutivas, como por exemplo, do caramujo transmissor da esquistossomose *B. glabrata*. Em um estudo realizando isolamento e caracterização do primeiro loci microssatélite de *B. glabrata*, concluiu-se que *B. glabrata* da América do Sul tem maior afinidade com espécies africanas do que outras espécies neotropicais, sendo a *B. tenagophila* a mais distante (JONES *et al.*, 1999).

Contudo, vários outros estudos genéticos foram realizados para verificar se existem diferentes níveis de reprodutividade em populações de *Biomphalaria*, geograficamente distintas. Como exemplo disso, foi realizado um trabalho, em que avaliaram a técnica de SSR-PCR para determinar a variabilidade genética de oito populações brasileiras distintas de *B. glabrata*. Foi observado, nesse trabalho, que a variabilidade genética foi maior entre populações do que dentro da população, e sem diferenças significativas entre populações de laboratório e de campo (CAMPOS *et al.*, 2002). Com isso, foi possível concluir que o microssatélite é um método molecular alternativo em estudos populacionais de *B. glabrata*. Em outro estudo, observou-se a variação de microssatélites de *B. glabrata* em duas populações da Venezuela Central. Também, foi testado o desequilíbrio genotípico em 40 situações, sendo observado que apenas quatro pares apresentaram desvios significativos das expectativas casuais (MAVÁREZ *et al.*, 2000).

A amplificação aleatória de DNA polimórfico (RAPD)

Outra análise alternativa é a técnica de PCR-RAPD (polimorfismos de DNA amplificados aleatoriamente), que amplifica regiões do DNA sem a necessidade do conhecimento prévio das sequências do organismo em estudo, portanto, não necessita de iniciadores específicos. Os produtos polimórficos são gerados pela amplificação de fragmentos do DNA através de pequenos iniciadores de sequências aleatórias e sob condições de baixa stringência (WILLIAMS *et al.*, 1990). O iniciador utilizado em cada reação produzirá fragmentos através do seu anelamento e distribuição ao acaso dentro do genoma. Os polimorfismos detectados pela PCR-RAPD podem ter origens em inserções ou deleções no sítio de ligação do iniciador, o que poderia alterar o tamanho final desses fragmentos ou, até mesmo, gerar novos locais de ligação dos iniciadores (WILLIAMS *et al.*, 1990).

Essa técnica foi utilizada em estudos relacionados à variabilidade genética de alguns organismos, como: *Lutzomyia* spp. (MARGONARI *et al.*, 2004), nematóides (COFCEWICZ *et al.*, 2004), moluscos do gênero *Lymnaea* spp. (CARDOSO *et al.*, 2006), dentre outros.

Recebido: jan./2022.

Publicado: jun./2022.

Em relação aos moluscos do gênero *Biomphalaria* spp., diversos estudos já foram realizados utilizando a técnica de PCR-RAPD (CARVALHO *et al.*, 2001). Esses autores estudaram a variabilidade genética de populações de *B. glabrata*, *B. tenagophila*, *B. occidentalis*, de várias regiões do Brasil, e encontraram uma baixa variabilidade intrapopulacional e uma alta variabilidade interpopulacional. Pesquisas realizadas com marcadores genéticos ligados à resistência em *B. glabrata* observaram bandas polimórficas somente na linhagem suscetível (SPADA *et al.*, 2002). Entretanto, quando se analisa a variabilidade genética de *B. tenagophila*, pode-se encontrar diferenças intrapopulacionais entre moluscos suscetíveis e resistentes (ABDEL-HAMID *et al.*, 1999). Em análises feitas com genoma de *S. mansoni* e de *B. glabrata*, observou-se um maior polimorfismo intraespecífico no molusco em relação ao parasito. Pode-se constatar, ainda, o importante papel da genética do molusco hospedeiro e sugere-se que esta pode ser mais importante que a do parasito na determinação da epidemiologia da esquistossomose (SIMPSON *et al.*, 1995).

A técnica de PCR-RAPD possui um grande potencial para detectar polimorfismos e, sendo uma ferramenta de baixo custo, torna-se acessível a muitos laboratórios, permitindo a estimativa de parâmetros genéticos em um curto espaço de tempo (LACERDA *et al.*, 2002).

Epidemiologia

Em virtude do gene COI apresentar níveis de divergência para estudos de diferenciação entre espécies (ROUGERIE *et al.*, 2009) e ser considerado um dos mais indicados para caracterização específica de organismos (HEBERT *et al.*, 2003), assim como para estudos de genética populacional e análises filogenéticas, a sequência nucleotídica desse gene vem sendo proposta de base para criação de um código de barra (HEBERT *et al.*, 2003).

As *Biomphalaria*s, com cerca de 37 espécies registradas, estão amplamente distribuídas pela América do Sul, América Central, Sul dos Estados Unidos, África, Sudoeste da Ásia (Arábia Saudita e Iêmen) (CARVALHO *et al.*, 2008), além de sua introdução no continente Europeu (MAJOROS *et al.*, 2008). No Brasil, ocorrem 11 espécies e uma subespécie de *Biomphalaria*, sendo três de importância na transmissão da esquistossomose: *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*. Diversos estudos têm sido desenvolvidos com o intuito de ampliar o conhecimento genético acerca dessas espécies, relacionados a padrões filogenéticos e identificação (RAWLINGS *et al.*, 2001).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em virtude da identificação de organismos ser um aspecto fundamental de diversos tipos de estudos biológicos, tais como ecologia, parasitologia, genética, entre outros; os métodos empregando técnicas moleculares têm sido utilizados ou aprimorados de forma rotineira, apresentando alta efetividade. No âmbito dessa tendência, a iniciativa da utilização de um código de barra de DNA (DNA *barcode*) vem sendo largamente implementada com o intuito de fomentar a padronização dos métodos moleculares utilizados para identificar espécies de organismos vivos, e aumentar a escala com que identificações confiáveis possam ser realizadas. Sendo assim, o conhecimento de técnicas de análises genéticas aplicadas a hospedeiros

intermediários de parasitoses pode auxiliar em pesquisas relacionadas à epidemiologia e controle populacional desses vetores transmissores da esquistossomose mansônica.

REFERÊNCIAS

ABDEL-HAMID, A.H.Z.; MOLFETTA, J.B.; FERNANDEZ, V.; RODRIGUES, V. Genetic variation between susceptible and non-susceptible snails to *Schistosoma* infection using random amplified polymorphic DNA analysis (RAPDs). *Revista Instituto Medicina Tropical São Paulo*, v.41, n.5, p.291-295, 1999.

CALDEIRA, R.L.; VIDIGAL, T.H.D.A.; PAULINELLI, S.T.; SIMPSON, A.J.G.; CARVALHO, O.S. Molecular identification of similar species of the genus *Biomphalaria* (Mollusca: Planorbidae) determined by a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, v.93, suppl.1, p.219-225, 1998.

CALDEIRA, R.L.; VIDIGAL, T.H.D.A.; SIMPSON, A.J.G.; CARVALHO, O.S. Genetic variability in Brazilian populations of *Biomphalaria straminea* complex detected by simple sequence repeat anchored polymerase chain reaction amplification. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, v.96, n.4, p.535-544, 2001.

CALDEIRA, R.L.; JANNOTTI-PASSOS, L.K.; CARVALHO, O.S. Sequencing of simple sequence repeat anchored polymerase chain reaction amplification products of *Biomphalaria glabrata*. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, v.97, suppl.1, p.23-26, 2002.

CALDEIRA, R.L.; JANNOTTI-PASSOS, L.K.; LIRA, P.M.; CARVALHO, O.S. Diagnostic of *Biomphalaria* snails and *Schistosoma mansoni*: DNA obtained from traces of shell organic materials. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, v.99, n.5, p.499-502, 2004.

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

CAMPOS, Y.R.; CARVALHO, O.S.; GOVEIA, C.O.; ROMANHA, A.J. Genetic variability of the main intermediate host of the *Schistosoma mansoni* in Brazil, *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda: Planorbidae) assessed by SSR-PCR. *Acta Tropica*, v.83, n.1, p.19-27, 2002.

CARDOSO, P.C.M.; CALDEIRA, R.L.; LOVATO, M.B.; COELHO, P.M.; BERNE, M.E.A.; MULLER, G.; CARVALHO, O.S. Genetic variability of Brazilian populations of *Lymnaea columella* (Gastropoda: Lymnaeidae), an intermediate host of *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea). *Acta Tropica*, v.97, p.339-345, 2006.

CARVALHO, O.S.; MASSARA, C.L.; GUERRA, H.L.; CAMPOS, Y.R.; CALDEIRA, R.L.; CHAVES, A.; KATZ, N. Reevaluation of Schistosomiasis in Minas Gerais, Brazil – III: Noroeste de Minas Mesoregion. *Revista Instituto Medicina Tropical São Paulo*, v.40, s/n, p.277-279, 1998.

CARVALHO, O.S.; CALDEIRA, R.L.; SIMPSON, A.J.; VIDIGAL, T.H. Genetic variability and molecular identification of Brazilian *Biomphalaria* species (Mollusca: Planorbidae). *Parasitology*, v.123, n.7, p.197-209, 2001.

Recebido: jan./2022.

Publicado: jun./2022.

- CARVALHO, O.S.; AMARAL, R.S.; THIENGO, S.C.; PIERI, O.S. Técnicas moleculares. In: CARVALHO, O.S.; AMARAL, R.S.; THIENGO, S.C.; PIERI, O.S. Vigilância e Controle de Moluscos de Importância Epidemiológica. 2ªed., Brasília: Ministério da Saúde, p.81-84, 2008.
- CHEN, J.; VIOLA, M.V. A method to detect ras point mutations in small subpopulations of cells. Analytical Biochemistry, v.195, n.1, p.51-6, 1991.
- COFCEWICZ, E.T.; CARNEIRO, R.; CASTAGNONE-SERENO, P.; QUÉNÉHERVÉ, P. Enzyme phenotypes and genetic diversity of root-knot nematodes parasitising Musa in Brazil. Nematology, v.6, n.1, p.85-95, 2004.
- COLLEY, D.G.; BUSTINDUY, A.L.; SECOR, W.E.; KING, C.H. Human Schistosomiasis. Lancet, v.383, n.9936, p.2253-64, 2014.
- DELIDOW, B.C.; LYNCH, J.P.; PELUSO, J.J.; WHITE, B.A. Polymerase chain reaction: basic protocols. In: WHITE, B.A. (ed.): PCR protocols: current methods and applications. Totowa, New Jersey: Humana Press, v.15, s/n, p.1-29, 1993.
- HEBERT, P.D.N.; RATNASINGHAM, S.; WAARD, J.R. Barcoding animal life: cytochrome oxidase subunit 1 divergences among closely related species. Proceedings Biological Sciences, v.270, suppl.1, p.96-99, 2003.
- HEID, C.A.; LIVAK, K.J.; WILLIAMS, P.M. Real time quantitative PCR. Genome Research, v.6, n.10, p.986-994, 1996.
- HIGUCHI, R.; FOCKLER, C.; DOLLINGER, G.; WATSON, R. Kinetic PCR analysis: real time monitoring of DNA amplification reactions. Biotechnology (Nature Publishing Company), v11, n.9, p.1026-1030, 1993.
- JONES, C.S.; LOCKYER, A.E.; ROLLINSON, D.; PIERTNEY, S.B.; NOBLE, L.R. Isolation and characterization of microsatellite loci in the freshwater gastropod, *Biomphalaria glabrata*, an intermediate host for *Schistosoma mansoni*. Molecular Ecology, v.8, n.12, p.2149-2151, 1999.
- KUBISTA, M.; ANDRADE, J.M.; BENGTSSON, M.; FOROOTAN, A.; JONÁK, J.; LIND, K.; SINDELKA, R.; SJÖBACK, R.; SJÖGREEN, B.; STRÖMBOM, L.; STÅHLBERG, A.; ZORIC, N. The realtime polymerase chain reaction. Molecular Aspects of Medicine, v.27, n.2/3, p.95-125, 2006.
- LACERDA, D.R.; ACEDO, M.D.P., LEMOS FILHO, J.P.; LOVATO, M.B. A técnica de RAPD: uma ferramenta molecular em estudos de conservação das plantas. Lundiana, v.3, n.2, p.87-89, 2002.
- MAJOROS, G.; FEHÉR, Z.; DELI, T.; FÖLDVÁRI, G. Establishment of *Biomphalaria tenagophila* snails in Europe. Emerging infectious diseases, v.14, n.11, p.1812-1814, 2008.

MARGONARI, C.S.; FORTES-DIAS, C.L.; DIAS, E.S. Genetic variability in geographical populations of *Lutzomyia whitmani* elucidated by RAPD-PCR. *Journal of Medical Entomology*, v.41, n.2, p.187-92, 2004.

MAVÁREZ, J.; AMARISTA, M.; POINTIER, J-P.; JARNE, P. Microsatellite variation in the freshwater schistosome-transmitting snail *Biomphalaria glabrata*. *Molecular Ecology*, v.9, n.7, p.1009-11, 2000.

MOLINA, A.L.; TOBO, P.R. Uso das técnicas de biologia molecular para diagnóstico. 2ª ed., Einstein: Série Biologia molecular, p.139-142, 2004.

OLIVEIRA, M.C.S.; REGITANO, L.C.A.; ROESE, A. D.; ANTHONISEN, D. G.; PATROCINIO, E.; SCAGLIUSI, S. M. M.; TIMOTEO, W. H. B.; JARDIM, S.N. Fundamentos teóricos-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia de polimerase. 1ª ed., São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2007. 43p. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/32770/1/LivroProtMolecular.pdf>> acesso em janeiro de 2022.

PAVAN, M.G.; MONTEIRO, F.A. Técnicas moleculares aplicadas à sistemática e ao controle vetorial. Vetores do Brasil. 2014, 289p. Disponível em: <<https://books.scielo.org/id/mw58j/pdf/galvao-9788598203096-13.pdf>> acesso em janeiro 2022.

RAWLINGS, T.A.; COLLINS, T.M.; BIELER, R. A major mitochondrial gene rearrangement among closely related species. *Molecular Biology and Evolution*, v.18, n.8, p.1604-9, 2001.

ROUGERIE, R.; DECAËNS, T.; DEHARVENG, L.; PORCO, D.; JAMES, S.W.; CHIH-HAN, C.; RICHARD, B.; POTAPOV, M.; SUHARDJONO, Y.; HEBERT, P.D.N. DNA barcodes for soil animal taxonomy. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.44, n.8, p.789-801, 2009.

SHI, M.M. Enabling large-scale pharmacogenetic studies by high-throughput mutation detection and genotyping technologies. *Clinical Chemistry*, v.47, n.2, p.164-72, 2001.

SIMPSON, A.J.; DIAS NETO, E.; VIDIGAL, T.H.; PENA, H.B.; CARVALHO, O.S.; PENA, S.D. DNA polymorphism of schistosomes and their snail hosts. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, v.90, n.2, p.211-3, 1995.

SPADA, R.G.; SILVA, D.; ABDEL-HAMID, A.Z.; SOBRAL-HAMAGUCHI, S.S.; ZUIM, N.R.B.; ZANOTTI-MAGALHÃES, E.M.; MAGALHÃES, L.A.; RIBEIRO-PAES, J.T. Genetic markers between *Biomphalaria glabrata* snails susceptible and resistant to *Schistosoma mansoni* infection. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, v.97, suppl.1, p.53-8, 2002.

SPATZ, L.; VIDIGAL, T.H.D.A.; CALDEIRA, R.L.; NETO, ED.; CAPPA, S.M.G.; CARVALHO, O.S. Study of *Biomphalaria tenagophila*, *B. t. guaibensis* and *B. occidentalis* by polymerase chain reaction amplification and restriction enzyme digestion of the ribosomal RNA gene intergenic spacer. *Journal of Molluscan Studies*, v.65, n.2, p.143-149, 1999.

SPATZ, L.; VIDIGAL, T.H.D.A.; SILVA, M.C.A.; CAPPA, S.M.G.; CARVALHO, O.S. Characterization of *Biomphalaria orbigny*, *Biomphalaria peregrina* and *Biomphalaria oligoza* by polymerase chain reaction and restriction enzyme digestion of the internal transcribed spacer

Recebido: jan./2022.

Publicado: jun./2022.

region of the RNA ribosomal gene. Memórias Instituto Oswaldo Cruz, v.9, n.6, p.807-814, 2000.

STEINMANN, P.; KEISER, J.; BOS, R.; TANNER, M.; UTZINGER, J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. The Lancet Infectious Diseases, v.6, n.7, p.411-25, 2006.

TEODORO, T.M.; JANNOTTI-PASSOS, L.K.; CARVALHO, O.S.; GRIJALVA, M.J.; BAÚS, E.G.; CALDEIRA, R.L. Hybridism between *Biomphalaria cousini* and *Biomphalaria amazonica* and its susceptibility to *Schistosoma mansoni*. Memórias Instituto Oswaldo Cruz, v.106, n.7, p.851-5, 2011.

VAS, A. Polymerase chain reaction and other gene techniques in pharmacogenetics: an introduction and review. Acta Physiologica Hungarica, v.79, n.3, p.253-601, 1992.

VIDIGAL, T.H.; NETO, E.D.; SIMPSON, A.J.G.; CARVALHO, O.S. A low stringency polymerase chain reaction approach to the identification of *Biomphalaria glabrata* and *B. tenagophila*, intermediate snail hosts of *Schistosoma mansoni* in Brazil. Memórias Instituto Oswaldo Cruz, v.91, n.6, p.739-44, 1996.

VIDIGAL, T.H.; CALDEIRA, R.L.; SIMPSON, A.J.G.; CARVALHO, O.S. Further studies on the molecular systematics of *Biomphalaria* snails from Brazil. Memórias Instituto Oswaldo Cruz, v.95, n.1, p.57-66, 2000a.

VIDIGAL, T.H.; KISSINGER, J.C.; CALDEIRA, R.L.; PIRES, E.C.; MONTEIRO, E.; SIMPSON, A.J.; CARVALHO, O.S. Phylogenetic relationships among Brazilian *Biomphalaria* species (Mollusca: Planorbidae) based upon analysis of ribosomal ITS2 sequences. Parasitology, v.121, n.6, p.611-20, 2000b.

WILLIAMS, J.G.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research, v.18, n.22, p.6531-6535, 1990.

WHO. World Health Organization. Schistosomiasis and soil-transmitted helminthiases: number of people treated in 2015. Weekly Epidemiol Record. 2016, v.91, p.53-60. Disponível em: <Erro! A referência de hiperlink não é válida.>. acesso em janeiro de 2020.