

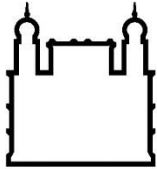
**MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

**ANÁLISE MORFO-MOLECULAR DE POPULAÇÕES DE *Biomphalaria
straminea* (DUNKER, 1848) (PULMONATA: PLANORBIDAE) DE
DIFERENTES REGIÕES GEOGRÁFICAS DO BRASIL**

RAIANY THULER NOGUEIRA

**Rio de Janeiro
Dezembro de 2022**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

RAIANY THULER NOGUEIRA

Análise morfo-molecular de populações de *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) (Pulmonata: Planorbidae) de diferentes regiões geográficas do Brasil.

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

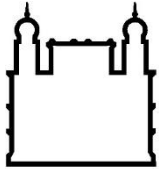
Orientadora: Prof. Dra. Silvana Aparecida Rogel Carvalho Thiengo

Coorientadora: Prof. Dra. Suzete Rodrigues Gomes

RIO DE JANEIRO

Dezembro de 2022

Ficha Catalográfica



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

RAIANY THULER NOGUEIRA

**Análise morfo-molecular de populações de *Biomphalaria straminea*
(Dunker, 1848) (Pulmonata: Planorbidae) de diferentes regiões
geográficas do Brasil**

Orientadora: Profa. Dra. Silvana Aparecida Rogel Carvalho Thiengo

Coorientadora: Profa. Dra. Suzete Rodrigues Gomes

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Dra. Clélia Christina Mello Silva Almeida da Costa

Dra. Fernanda Pires Ohlweiler

Dra. Luciana Sanches Dourado Leao

Dr. Arnaldo Maldonado Junior

Dr. Ricardo Moratelli Mendonça da Rocha

Rio de Janeiro, ____de dezembro de 2022

FONTES DE FINANCIAMENTO

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Instituto Oswaldo Cruz/Fundação Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ)

À minha filha, que renovou minhas esperanças,
e à minha família que tornou tudo possível.

AGRADECIMENTOS

À minha filha, meu companheiro, meu enteado, meus pais e meus irmãos, que diariamente me deram forças para a conclusão deste curso, sempre me acolhendo com amor e compreensão, me apoiando nos dias mais difíceis e me incentivando a nunca desistir.

À minha orientadora Dra. Silvana Carvalho Thiengo e coorientadora Dra. Suzete Rodrigues Gomes, por estarem sempre do meu lado, me acompanhando nos experimentos e trabalhos de bancada, bem como me auxiliando diante dos obstáculos que enfrentei durante a execução do estudo, mesmo que remotamente e com tantos desafios.

À Dra. Monica Ammon Fernandez, grande incentivadora deste trabalho, por ter dedicado seu tempo ao me ensinar técnicas de dissecação, interpretação dos resultados, dentre tantos outros aprendizados.

À toda equipe do Laboratório de Referência Nacional para Esquistossomose-Malacologia do Instituto Oswaldo Cruz (LRNEM/IOC), por todo auxílio no desenvolvimento deste trabalho, desde a manutenção das colônias mantidas no Moluscário até os ensinamentos passados durante treinamentos internos.

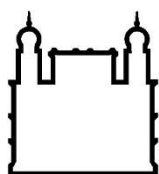
Ao Eduardo Cinilha e Marta Chagas Pinto do LRNEM por toda ajuda técnica que seguramente constitui valiosa contribuição para aprimorar a qualidade das fotografias e desenhos.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, Kevin Portilho Barbosa, Arielly Porfirio de Sousa e Carolina Rodrigues Marchi, que muito contribuíram para execução deste trabalho, através do auxílio com as análises moleculares e filogenéticas, bem como a revisão do artigo e todo conhecimento fornecido ao longo do curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento através da bolsa de estudo e ao IOC pelo fornecimento de material, equipamentos e toda estrutura necessária à realização dos experimentos.

**“Para ser um bom observador
é preciso ser um bom teórico.”**

(Charles Darwin)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Análise morfo-molecular de populações de *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) (Pulmonata: Planorbidae) de diferentes regiões geográficas do Brasil

RESUMO

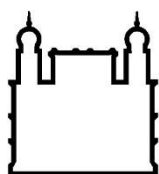
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIODIVERSIDADE E SAÚDE

Raiany Thuler Nogueira

Biomphalaria straminea é um dos três planorbídeos que atuam como hospedeiros intermediários de *Schistosoma mansoni* no Brasil e é responsável pela manutenção de altas taxas de esquistossomose mansoni em algumas áreas endêmicas do nordeste brasileiro. A principal característica morfológica de *B. straminea* é o acentuado enrugamento vaginal, embora também esteja presente em algumas espécies congêneras que formam um grupo conhecido como complexo *B. straminea*. O objetivo deste estudo foi analisar variações intraespecíficas em *B. straminea* com base em análises morfológicas e moleculares de espécimes de 10 diferentes localidades das cinco regiões geográficas do Brasil. As conchas foram medidas com paquímetro, considerando dois parâmetros: diâmetro e altura. Os exemplares foram dissecados sob estereomicroscópio e as estruturas do sistema reprodutor desenhadas em câmara clara e mensuradas. Foram consideradas 16 características morfológicas e 8 proporções entre elas. Os genes ITS2 (460 pb) e COI (710 pb) foram sequenciados, sendo analisados por meio de análises filogenéticas, divergência genética e rede de haplótipos (COI). Quinze

sequências de oito táxons, incluindo diferentes espécies de *Biomphalaria*, além de espécies de *Helisoma* (grupo irmão) foram utilizados como grupo externo nas análises de inferência filogenética. Observamos uma grande variação intraespecífica em todas as estruturas morfológicas examinadas, com alguns espécimes tendo apresentado enrugamento vaginal discreto e de aspecto inchado. As análises de divergência genética também demonstraram um nível significativo de variabilidade intraespecífica em *B. straminea*, até 5% no COI e até 3% no ITS2. A análise de distribuição dos haplótipos COI recuperou 16 haplótipos e diversidade haplotípica de 0,9088 para *B. straminea*. Sequências do *GenBank* identificadas como *B. kuhniana* e utilizadas como grupo-externo foram recuperadas entre as sequências de *B. straminea*, indicando que esta pode tratar-se de uma variação da primeira. Nossos resultados corroboram a já conhecida variabilidade morfológica e genética de *B. straminea* e demonstram a necessidade de ampliar o estudo, incluindo populações de outras espécies com características semelhantes, preferencialmente procedentes de suas localidades-tipo, visando avaliar a validade das espécies consideradas próximas de *B. straminea*, como *B. kuhniana*.

Palavras-chave: Gastropoda, complexo *Biomphalaria straminea*, taxonomia, COI, ITS2, filogenia, rede de haplótipos.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Morpho-molecular analysis of populations of *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) (Pulmonata: Planorbidae) from different geographic regions of Brazil.

Abstract

MASTER DISSERTATION IN BIODIVERSITY AND HEALTH

Raiany Thuler Nogueira

Biomphalaria straminea is one of the three planorbids that act as intermediate hosts of *Schistosoma mansoni* in Brazil and is responsible for maintaining high rates of schistosomiasis in some endemic areas of northeastern Brazil. The main morphological characteristic of *B. straminea* is accentuated vaginal wrinkling, although it is also present in some congeneric species that form a group known as the *B. straminea* complex. This study aimed to analyze intraspecific variations in *B. straminea* based on morphological and molecular analyses of specimens from 10 different localities in Brazil's five geographic regions. The shells were measured with a caliper, considering two parameters: diameter and height. The specimens were dissected under a stereomicroscope and the structures of the reproductive system were drawn in a camera lucida and measured. We considered 16 morphological characteristics and 8 proportions between them. The ITS2 (460 bp) and COI (710 bp) genes were sequenced and analyzed through phylogenetic analysis, genetic divergence, and haplotype network (COI). Fifteen sequences from eight taxa, including different species of *Biomphalaria*, in addition to species of *Helisoma* (sister group), were used as outgroups in the phylogenetic inference analyses. We

observed a large intraspecific variation in all the morphological structures examined, with some specimens having mild vaginal wrinkling and a swollen appearance. Genetic divergence analyses also demonstrated a significant level of intraspecific variability in *B. straminea*, up to 5% in COI and up to 3% in ITS2. The distribution analysis of COI haplotypes recovered 16 haplotypes and haplotypic diversity of 0.9088 for *B. straminea*. GenBank sequences identified as *B. kuhniana* and used as an outgroup were recovered between the *B. straminea* sequences, indicating that this may be a variation of the former. Our results corroborate the already known morphological and genetic variability of *B. straminea* and demonstrate the need to expand the study, including populations of other species with similar characteristics, preferably from their type localities, in order to assess the validity of species considered close to *B. straminea*, such as *B. kuhniana*.

Keywords: Gastropoda, *Biomphalaria straminea* complex, taxonomy, COI, ITS2, phylogeny, haplotype network.

ÍNDICE

RESUMO	IX
ABSTRACT	XI
1. INTRODUÇÃO	20
1.1 Revisão Bibliográfica	22
1.1.1 Aspectos Biológicos e Ecológicos de representantes do gênero <i>Biomphalaria</i>	22
1.1.2 Biogeografia de representantes do gênero <i>Biomphalaria</i>	26
1.1.3 Taxonomia de <i>Biomphalaria</i> com ênfase em <i>B. straminea</i>	27
1.1.4 DNA ribossômico (DNAr) nuclear	31
1.1.4.1 Espaçador transcrito interno (ITS)	31
1.1.4.2 ITS na identificação de espécies de <i>Biomphalaria</i>	33
1.1.5 DNA mitocondrial (DNAm)	34
1.1.5.1 Citocromo C Oxidase I (COI) – DNA Barcode	36
1.1.5.2 COI na identificação de espécies de <i>Biomphalaria</i>	36
1.1.6 Complexo <i>Biomphalaria straminea</i>	37
1.1.7 Importância epidemiológica e distribuição geográfica de <i>B. straminea</i>	40
1.2 Justificativa	43
1.3 Objetivos	43
1.3.1 Objetivo geral	43
1.3.2 Objetivos específicos	43
2. MATERIAL E MÉTODOS	44
2.1 Obtenção e processamento das amostras	44
2.2 Análise das amostras	47

2.2.1 Morfologia da concha e sistema reprodutor	47
2.2.2. Análises moleculares	50
2.2.2.1 Extração, amplificação por PCR e sequenciamento do DNA..	50
2.2.2.2 Seleção de sequências e grupo externo	52
2.2.2.3 Alinhamento, análises filogenéticas, divergência genética e rede de haplótipos	54
3. RESULTADOS	55
3.1 Morfologia da concha e sistema reprodutor	55
3.2 Análise filogenética e divergência genética	60
3.3 Rede de haplótipos	62
4. DISCUSSÃO	66
5. CONCLUSÃO	77
6. ANEXOS	77
6.1 Anexo 1. Táxons da família Planorbidae utilizados nas análises filogenéticas e os respectivos códigos do <i>Genbank</i> para acesso às sequências	77
6.2 Anexo 2. Localidades dos espécimes de <i>Biomphalaria straminea</i> sequenciados no presente estudo e seus respectivos códigos (provisórios) do <i>Genbank</i>	79
6.3 Anexo 3. Códigos de acesso às sequências de <i>Biomphalaria straminea</i> do <i>GenBank</i> e suas respectivas localidades no estado de São Paulo (Palasio <i>et</i> <i>al.</i> , 2017) utilizadas na análise de distribuição haplotípica (COI)	81
6.4 Anexo 4. Parâmetros morfológicos dos sistemas reprodutores masculino e feminino nos espécimes de <i>Biomphalaria straminea</i> obtidos nos municípios e estados representativos das diferentes regiões do Brasil	82
6.5 Anexo 5. Médias das proporções entre os parâmetros morfológicos registrados em cada localidade de <i>Biomphalaria straminea</i>	83
6.6 Anexo 6. Média e desvio padrão do diâmetro e altura das conchas de <i>Biomphalaria straminea</i> dos diferentes locais analisados	83

6.7 Anexo 7. Árvore filogenética gerada pela análise do gene COI de <i>Biomphalaria straminea</i> e grupo externo incluídos no estudo por Inferência Bayesiana. Os valores de suporte dos ramos são probabilidades posteriores bayesianas (PPBs)	84
6.8 Anexo 8. Árvore filogenética gerada pela análise do gene ITS2 de <i>Biomphalaria straminea</i> e grupo externo incluídos no estudo por Inferência Bayesiana. Os valores de suporte dos ramos são probabilidades posteriores bayesianas (PPBs)	85
6.9 Anexo 9. Distâncias genéticas intra e interespecíficas do gene COI recuperadas através do modelo Kimura 2 Parâmetros (Kimura, 1980) no software MEGAX (Kumar et al., 2018)	86
6.10 Anexo 10. Distâncias genéticas intra e interespecíficas do gene ITS2 recuperadas através do modelo Kimura 2 Parâmetros (Kimura, 1980) no software MEGAX (Kumar et al., 2018)	88
REFERÊNCIAS	90

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo do trematódeo <i>Schistosoma mansoni</i>	20
Figura 2. Diagrama ilustrando a organização dos cistrons ribossômicos nucleares (caixa cinza) de uma célula eucarionte típica (adaptado de Coleman, 2003)	32
Figura 3. Ilustração mostrando os genes do DNAm _t de <i>Biomphalaria straminea</i> . Demais componentes do DNAm _t foram omitidos nesta ilustração (Adaptado de Goveia, 2010)	35
Figura 4. Ilustração mostrando a ordem gênica de <i>Biomphalaria glabrata</i> , <i>Biomphalaria tenagophila</i> e <i>Biomphalaria straminea</i> , de cima para baixo, respectivamente. Foram omitidos os componentes do DNAm _t não sequenciados	35
Figura 5. Ilustração do sistema reprodutor de <i>Biomphalaria straminea</i> destacando o enrugamento vaginal	37
Figura 6. Ilustração do sistema reprodutor de <i>Biomphalaria intermedia</i>	38
Figura 7. Ilustração do sistema reprodutor de <i>Biomphalaria kuhniana</i>	38
Figura 8. Mapa indicando a distribuição geográfica de <i>Biomphalaria straminea</i> no Brasil	41
Figura 9. Colônia de <i>Biomphalaria straminea</i> mantida no Laboratório de Referência Nacional para Esquistossomose – Malacologia (LRNEM)	44
Figura 10. Mapa do Brasil com a localização das dez localidades de <i>Biomphalaria straminea</i> analisadas procedentes da Coleção Viva de moluscos do Laboratório de Referência Nacional para Esquistossomose- Malacologia do Instituto Oswaldo Cruz - LRNEM-IOC	45
Figura 11. A. Material necessário à técnica de fixação de moluscos. B. Exemplares de <i>Biomphalaria</i> spp. anestesiados em Hypnol a 1% e submersos em água a 70°C	46
Figura 12. A-D. Etapas da retirada de <i>Biomphalaria</i> spp. da concha	47

Figura 13. A. Espécime de <i>Biomphalaria straminea</i> anestesiado em Hypnol a 1%, fixado e pronto para ser dissecado sob estereomicroscópio. B. Dissecção de exemplar de <i>Biomphalaria straminea</i> sob estereomicroscópio e com auxílio de placa de Petri e pinças de pontas finas	47
Figura 14. Esquema parcial do sistema reprodutor de <i>Biomphalaria straminea</i> ilustrando as principais estruturas analisadas no estudo. Abreviações: pp : prepúcio; bp : bainha do pênis; cd : canal deferente; pr : próstata; es : espermateca; ev : enrugamento vaginal; va : vagina	49
Figura 15. Medida da altura da concha de <i>Biomphalaria straminea</i> sendo aferida utilizando paquímetro digital	49
Figura 16. Foto da concha de <i>Biomphalaria straminea</i> mostrando como foram aferidas as medidas de diâmetro (à esquerda) e altura (centro)	50
Figura 17. Gel de agarose contendo produtos das reações de PCR visualizados em transiluminador UV. A. Gene ITS2. B. Gene COI. Amostras (ambos os genes): 1: Padrão de peso molecular; 2: Uruaçu/GO 6; 3: Itapagipe/MG 2; 4: Controle positivo; 5: Controle negativo	51
Figura 18. Eletroferograma de sequência de nucleotídeos do gene COI editado manualmente no software Seqman versão 7	52
Figura 19. Fotografia de parte do sistema reprodutor de <i>Biomphalaria straminea</i> mostrando a estrutura do enrugamento vaginal do espécime 7 de Nossa Senhora de Lourdes/SE. Abreviaturas: es : espermateca; ev : enrugamento vaginal; cd : canal deferente; va : vagina	55
Figura 20. Fotografia do sistema reprodutor completo do espécime 8 de <i>Biomphalaria straminea</i> proveniente de Sapucaia/PA, mostrando os três divertículos prostáticos, bem como o enrugamento vaginal típico da espécie. Abreviaturas: pr : próstata; ev : enrugamento vaginal	56
Figura 21. Parte do sistema reprodutor de <i>Biomphalaria straminea</i> mostrando a variação intraespecífica no grau de enrugamento vaginal nos exemplares provenientes de Sapucaia/PA (a, b e c são os espécimes 1, 2 e 5, respectivamente)	57

- Figura 22.** Diagrama de parte do sistema reprodutor de *Biomphalaria straminea* mostrando a relativa ausência de variação intraespecífica no grau de enrugamento vaginal observado nos espécimes de Londrina/PR, (a, b, c, d, e e são os espécimes 9, 3, 2, 5 e 6, respectivamente) 57
- Figura 23.** Desenhos de parte do sistema reprodutor de *Biomphalaria straminea* mostrando as estruturas da parede dorsal da vagina e enrugamento vaginal, (a) espécime 3 de Parauapebas/PA com oito curvas, e (b) espécime 1 de Itapagipe/MG com oito curvas) 58
- Figura 24.** Diagrama da próstata de *Biomphalaria straminea* mostrando a variação intraespecífica do número de divertículos prostáticos nos espécimes de Uruaçu/GO: (a) espécime 5, com 7 divertículos e (b) espécime 2, com 14 divertículos 58
- Figura 25.** Conchas de *Biomphalaria straminea* de (a) Pelotas/RS (espécime 1) e (b) Sapucaia/PA (espécime 3) 59
- Figura 26.** Árvore filogenética gerada pela análise dos genes concatenados (COI + ITS2) de *Biomphalaria straminea* e grupo externo incluídos no estudo por Inferência Bayesiana. Os valores de suporte dos ramos são probabilidades posteriores bayesianas (PPBs) 61
- Figura 27.** Rede de haplótipos das sequências do gene COI de *Biomphalaria straminea* analisadas e sequências de *Biomphalaria straminea* disponíveis no Genbank. Cada localidade é representada por uma cor diferente, conforme mostrado na legenda. Cada círculo representa um haplótipo e seu tamanho é proporcional ao número de indivíduos que compartilham esse haplótipo. Os losangos vermelhos representam haplótipos que não foram amostrados ou extintos. A lacuna marcada com um asterisco (*) representa um total de 405 mutações 64
- Figura 28.** Rede de haplótipos das sequências do gene COI de *Biomphalaria straminea* analisadas e sequências de *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria kuhniana* disponíveis no Genbank. Cada localidade é representada por uma cor diferente, conforme mostrado na legenda. Cada círculo representa um haplótipo e seu tamanho é proporcional ao número de indivíduos que

compartilham esse haplótipo. Os losangos vermelhos representam haplótipos que não foram amostrados ou extintos 65

Figura 29. Localização dos municípios de Itapagipe e Uruaçu, e os principais rios dos estados de Minas Gerais e Goiás 71

Figura 30. Localização da cidade do Rio de Janeiro e do município de Itariri, e os principais rios dos estados do Rio de Janeiro e São Paulo 72

Figura 31. Localização dos municípios de Londrina e Ilhabela e os principais rios dos estados do Paraná e São Paulo 73

Figura 32. Localização dos municípios de Minaçu e Uruaçu, GO, e os reservatórios das Usinas Hidrelétricas de Serra da Mesa e Cana Brava, respectivamente 74

1. INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma doença tropical negligenciada causada pelos trematódeos do gênero *Schistosoma* e ocorre na região Neotropical, na África e no Oriente Médio, tendo sido relatada em 78 países. Segundo a Organização Mundial de Saúde – OMS aproximadamente 240 milhões de pessoas são afetadas pela esquistossomose no mundo e mais de 700 milhões vivem em áreas de risco. A esquistossomose mansoni é endêmica no Brasil e continua sendo um problema de saúde pública, de acordo com o mais recente levantamento nacional de prevalência (Katz, 2018), acometendo principalmente comunidades que não possuem saneamento e sistema de saúde pública adequados (BRASIL, 2014; OMS, 2020). O levantamento anual mais recente da esquistossomose no país registrou 21.962 casos ocorridos em áreas endêmicas, e 3.836 casos em áreas não endêmicas, com 186 internações e 508 notificações de óbito (OMS, 2020).

No Brasil, os três principais hospedeiros intermediários de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 são os moluscos *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), *Biomphalaria tenagophila* (d'Orbigny, 1835) e *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848). Estes gastrópodes desempenham papel essencial para o desenvolvimento do ciclo do parasito (BRASIL, 2008), que pode ser visto na Figura 1:

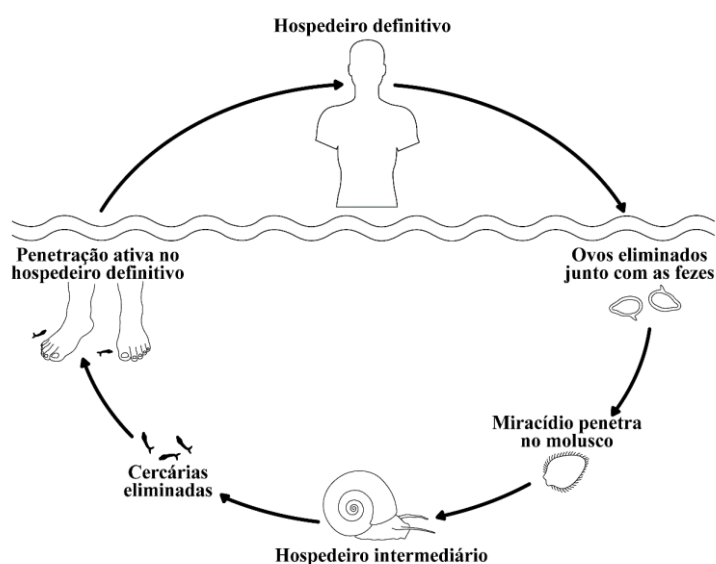


Figura 1. Ciclo do trematódeo *Schistosoma mansoni* (Eduardo Cinilha).

Os moluscos do gênero *Biomphalaria* possuem concha plano-espiral, suas dimensões variam entre as espécies e a cor natural da concha é amarelo-palha, podendo sofrer modificação na coloração devido o contato com substâncias presentes nas águas dos criadouros (PARAENSE, 1972).

Apesar de algumas espécies de *Biomphalaria* terem sido descritas pela primeira vez com base na observação de caracteres conquiliológicos, estas características não permitem sua identificação específica, sendo distinguíveis morfológicamente somente após a dissecação e análise dos sistemas excretor e reprodutor. *B. glabrata* possui uma crista sobre o tubo renal e, no sistema reprodutor, *B. tenagophila* e *B. straminea* apresentam uma bolsa vaginal e ondulações transversais na parede dorsal da vagina (enrugamento vaginal), respectivamente (PARAENSE, 1975).

Ao comentar sobre a especiação nos animais, em especial aos moluscos planorbídeos, Paraense (1957) destacou que para saber se uma espécie é polimórfica é preciso estudá-la pelo menos em uma área suficientemente vasta, senão em todo o seu território de distribuição, e que somente desta forma se torna possível analisar os graus de divergência entre as subpopulações, dentre outros aspectos. O autor ressaltou ainda que os planorbídeos tendem a constituir subpopulações com características divergentes, mesmo quando não ocupam áreas geográficas distintas.

Em relação à *B. straminea*, o indicativo de que há haplótipos, que representam subpopulações ou populações em processo de especiação, é reforçado pelos estudos sobre a suscetibilidade destes planorbídeos quando submetidos a infecções experimentais com cepas de *S. mansoni*. Barbosa e Figueiredo (1970), Souza et. al (1983), Almeida e Mendonça (1986) e Fernandez e Pieri (2001) observaram índices de infecção variando entre 0 e 48% em populações procedentes do Alagoas, Ceará, Paraíba, Piauí, Pernambuco e Rio Grande do Norte.

1.1 Revisão Bibliográfica

1.1.1 Aspectos Biológicos e Ecológicos de representantes do gênero *Biomphalaria*

A maioria dos estudos sobre a biologia destes moluscos consiste em observações de laboratório, fora de seu habitat e da dinâmica do ecossistema, isto é, sem as pressões do ambiente natural e a presença de competidores ou predadores (PARAENSE, 1972). Apesar dos estudos de laboratório serem eficientes ao fornecer dados sobre seu ciclo vital, relacionar essas informações a eventos que ocorrem na natureza não é uma tarefa simples (HAAS, 1952).

Biomphalaria spp. são hermafroditas, assim como os demais pulmonados, sendo capazes de realizar autofecundação em condições de isolamento, o que concede uma vantagem na reconstituição das populações através de um único espécime, após condições adversas (PARAENSE, 1955). Em condições naturais, no entanto, a reprodução ocorre preferencialmente através de fecundação cruzada, conferindo maior variabilidade genética às suas populações (PARAENSE, 1955). Durante a cópula, um espécime desempenha a função de macho e o outro da fêmea, dificilmente ocorrendo cópula cruzada, na qual os indivíduos são fecundados simultaneamente (PARAENSE, 1972).

O comportamento destes planorbídeos de se reproduzirem por fecundação cruzada desde que tenham contato com outros indivíduos de sua espécie confere à essas populações mecanismos evolutivos semelhantes aos demais grupos de organismos hermafroditas mais extensivamente estudados (PARAENSE, 1957). A autofecundação pode ocasionar processos de especiação simpátrica, o que não deve ser negligenciado em investigações sobre a evolução dos planorbídeos (PARAENSE, 1957). Vale ressaltar que a capacidade de autofecundação pode explicar a existência de populações que apresentam características próprias e com pouca variação entre os indivíduos (PARAENSE, 1957).

Fatores como fecundidade, fertilidade e longevidade destes planorbídeos tem sido estudados em condições de laboratório por diversos autores (PARAENSE, 1955; PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, 1958; PENIDO; PINTO; DESLANDES,

1951; BARBOSA; PIMENTEL-SOUZA; SAMPAIO, 1987; COSTA; GRAULT; CONFALONIERI, 2004). Costa, Gault e Confalonieri (2004) observaram através de seu estudo comparativo que a autofecundação é mais eficiente em *B. straminea* do que em *B. glabrata*, com base nas taxas de fecundidade intraespecífica, e que *B. straminea* apresentou maior potencial reprodutivo quando em contato com outros indivíduos, assim como quando estava isolada. Foi observada fertilidade relativamente alta para ambas as espécies, não havendo diferenças significativas entre elas. A fecundidade e fertilidade foram analisadas com base no número de posturas, ovos e ovos por cápsula ovígera, além da quantidade de ovos viáveis e taxa de eclosão, respectivamente (COSTA; GRAULT; CONFALONIERI, 2004).

Com relação ao desenvolvimento, o crescimento dos indivíduos está sujeito a grandes variações, inclusive entre aqueles provenientes de uma mesma postura, não sendo possível determinar a idade dos espécimes baseando-se apenas em seu tamanho (PARAENSE, 1972). Segundo este mesmo autor, em indivíduos que vivem em ambientes de águas paradas e por conseguinte, onde há maior concentração de alimentos, é observado tamanho médio geralmente maior do que naqueles que habitam águas correntes. Já em criadouros, onde ocorrem ciclos estacionais de dessecação, os indivíduos que sobrevivem podem ficar em diapausa durante meses e a interrupção de crescimento na estação seca pode acentuar ainda mais a desproporção entre idade e tamanho dos exemplares (PARAENSE, 1972).

Quanto a longevidade, poucos indivíduos atingem idade avançada, podendo ultrapassar dois anos e, como dito anteriormente, não há dados dessas observações em condições naturais, mas considerando a alta fertilidade dessas espécies, pode-se inferir uma alta mortalidade natural, principalmente entre os espécimes juvenis (PARAENSE, 1972). Este mesmo autor ressalta que em decorrência dos efeitos de chuvas e estiagens é muito provável que as populações de criadouros naturais se renovem quase que por completo anualmente.

Além destes fatores, outras características biológicas destes planorbídeos são relevantes para sua sobrevivência, dispersão e colonização, como a adaptação à dessecação de corpos d'água sazonais, a capacidade de obtenção de oxigênio dissolvido na água (pseudobrânquia) e no ar (pneumóstomo), permitindo a presença

destes moluscos em ambientes eutrofizados e com pouca disponibilidade de oxigênio, assim como a capacidade de permanecer em imersão durante longos períodos, concedendo proteção contra predação (TAYLOR, 1988; PIERCE, 1993; TELES; CARVALHO, 2008). Estas características permitem a manutenção de elevadas densidades populacionais e a capacidade de colonizar diversos ambientes (TELES; CARVALHO, 2008).

Esses moluscos ocorrem preferencialmente em ambientes lênticos com velocidades de até 30cm por segundo, como remansos de rios, riachos, lagoas, e quaisquer outras áreas alagadas natural ou artificialmente. Os ambientes mais vantajosos para a colonização pelas populações de *Biomphalaria* são aqueles ricos em matéria orgânica e microflora, pouca turbidez, alta incidência de luz e com temperaturas entre 20° e 25° C (PARAENSE, 1972). Sua alimentação depende do substrato e é bastante variada, desde folhas e algas até organismos em decomposição e excrementos de outros animais (PARAENSE, 1972).

Dentre os predadores naturais destes planorbídeos e suas desovas podemos citar: peixes, anfíbios, crustáceos, aves, insetos aquáticos, sanguessugas e outros moluscos. Além disso, os trematódeos são parasitos responsáveis por alterações teciduais relevantes e alta mortalidade dos moluscos que são infectados (PARAENSE, 1972).

Um estudo sobre a ecologia do gênero *Biomphalaria* conduzido no estado de Pernambuco mostrou que *B. straminea* estava presente em habitats semipermanentes, como córregos de água transparente e pouca profundidade, com baixas taxas de coliformes fecais e muita incidência de luz solar (AMARISTA, 2010). Quanto aos substratos e vegetações nestes habitats foram encontrados argila, areia, pedra e barro (em alguns casos) e *Nasturtium* spp. e gramíneas, respectivamente (AMARISTA, 2010). Por outro lado, *B. glabrata* foi encontrada em habitats permanentes como rios, lagoas, e canais, e temporários, como córregos, geralmente com sombra e contaminação fecal direta e constante. Os substratos encontrados foram barro, areia e pedra, e as vegetações presentes foram *Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes*, *Typha* spp., *Nymphae lotus*, e muita gramínea (AMARISTA, 2010).

Alguns autores relatam que as espécies de *Biomphalaria* são encontradas em áreas geográficas distintas, podendo ser encontradas no mesmo município, mas

separadas por quilômetros ou no mesmo habitat, mas em nichos separados, como mostram os dados de Barbosa et al. (1993) e Amarista (2010).

Entretanto, a coexistência dessas espécies no mesmo biótopo, que inicialmente parecia ocorrer de forma mais rara, tem sido relatada cada vez mais (PARAENSE; DESLANDES, 1955; TELES, 1996; PIMENTA, 2010). Populações de *B. straminea* e *B. glabrata* foram observadas ocorrendo simpatricamente no Córrego do Bambu, em Governador Valadares, estado de Minas Gerais, (PARAENSE; DESLANDES, 1955), bem como *B. glabrata* e *B. tenagophila* em um criadouro localizado na bacia do Ribeirão do Melo, também em Minas Gerais (PIMENTA, 2010). Teles (1996) observou *B. straminea* coexistindo com *B. tenagophila* em diferentes municípios do Vale do Paraíba, em Campinas e Americana, e com *B. glabrata* e *B. tenagophila* no rio Paranapanema, indicando que as mesmas condições ecológicas podem ser favoráveis a sobrevivência dessas espécies.

Estudos de laboratório mostram que *B. straminea* apresenta dominância em relação às outras espécies do grupo, podendo reduzir significativamente e até mesmo excluir por completo as populações de *B. glabrata* em alguns habitats e sob determinadas condições (BARBOSA; PEREIRA DA COSTA; ARRUDA, 1981; BARBOSA, 1987). Essa dominância estaria relacionada às altas taxas reprodutivas de *B. straminea* (BARBOSA et al., 1992) e maior adaptação a dessecação dos corpos d'água (BARBOSA; PEREIRA DA COSTA; ARRUDA, 1981; BARBOSA et al., 1992; BARBOSA; BARBOSA; ARRUDA, 1993), sendo capaz de habitar criadouros mais rasos, com metade do volume de água necessário para *B. glabrata*, quando submetidas a pressão populacional.

Esses dados são corroborados por um estudo experimental de campo, no qual populações de *B. straminea* foram introduzidas em criadouros habitados somente por *B. glabrata*. Foi observada exclusão competitiva de *B. glabrata* por *B. straminea* em seis dos nove riachos analisados e, durante o período do estudo (1980 a 1989), nunca foi observado retorno das populações de *B. glabrata* aos criadouros (BARBOSA; BARBOSA; ARRUDA, 1993). Os autores atribuem o sucesso do estabelecimento de *B. straminea* em detrimento de *B. glabrata* a seca sazonal e a sua capacidade de adaptação a dessecação (BARBOSA; BARBOSA; ARRUDA, 1993).

A substituição de populações de *B. glabrata* por *B. straminea* através de processos naturais foi documentada por Barbosa, Pereira da Costa e Arruda (1981), nos municípios de Olinda e Paulista, estado de Pernambuco, os quais foram monitorados desde a década de 50. Após diversas coletas durante os anos de 1978 e 1979, foi constatado que grande parte dessas áreas, anteriormente ocupadas por *B. glabrata*, haviam sido invadidas por *B. straminea*. Os autores ressaltam que essa substituição natural ocorreu entre os anos de 1957 e 1978 e de forma rápida, indicando que *B. straminea* é “uma espécie agressiva pronta para ocupar os espaços deixados por competidores mais fracos” (BARBOSA; PEREIRA DA COSTA; ARRUDA, 1981).

1.1.2 Biogeografia do gênero *Biomphalaria*

A origem do gênero *Biomphalaria* é considerada de Gondwana até 100 milhões de anos e sua distribuição atual estaria atribuída à separação da África e da América do Sul (PILSBRY, 1911; DAVIS, 1980; DAVIS, 1992). Outra hipótese sugere que *Biomphalaria* surgiu na América do Sul após a separação dos continentes e sua presença na África é resultante de um evento de dispersão transatlântica que pode ter ocorrido pelo transporte passivo de massas de ovos ou de indivíduos adultos resistentes à dessecação por aves aquáticas (WOODRUFF; MULVEY, 1997). Campbell et al. (2000) levantaram a hipótese alternativa de que uma espécie ancestral neotropical, semelhante a *B. glabrata*, teria colonizado a África.

As formas fósseis de *Biomphalaria* são abundantes em sedimentos do Eoceno e Oligoceno na América do Norte, Europa e Ásia, e a maioria foi descrita sob o gênero *Planorbis* ou *Australorbis* (TAYLOR, 1988; PIERCE, 1993), atualmente considerados sinônimos de *Biomphalaria*. Os fósseis da América do Norte aparecem no final do Eoceno, não havendo evidências de precursores em rochas mais antigas e ocorrem ao norte da *B. glabrata* moderna, podendo representar a espécie americana viva (TAYLOR, 1988).

DeJong et al. (2001) analisaram 23 espécies de *Biomphalaria*, sendo 16 neotropicais e 7 africanas, utilizando sequências de nucleotídeos mitocondriais

parciais (16S) e nucleares ribossômicas completas (ITS1 e ITS2), e observaram que as espécies neotropicais são basais às espécies africanas, sugerindo uma origem americana para o gênero. Além disso, os autores ressaltam outras evidências que apoiam uma origem americana, como a maior diversidade à suscetibilidade à *S. mansoni* das espécies neotropicais em relação às africanas. O maior número de espécies neotropicais, o fato de essas espécies exibirem uma faixa maior em tamanho geral e de que as espécies neotropicais apresentam uma maior variação genética do que as espécies africanas, indicaria que elas são mais antigas.

Estudos com aloenzimas (BANDONI; MULVEY; LOKER, 1995; WOODRUFF; MULVEY, 1997) e sequências de DNA (CAMPBELL et al., 2000; DEJONG et al., 2001) mostraram que *B. glabrata* é mais relacionada às espécies africanas que com as demais espécies neotropicais, além da monofilia e parafilia dos clados africanos e neotropicais, respectivamente (BANDONI; MULVEY; LOKER, 1995; WOODRUFF; MULVEY, 1997; DEJONG et al., 2001). Apesar da estreita relação entre *B. glabrata* e as espécies africanas, DeJong et al. (2001) reforçam que os resultados de suas análises não sustentam a hipótese de Woodruff e Mulvey (1997), de que *B. glabrata* é derivada dessas espécies, mas corroboram os dados de Campbell et al. (2000), de que um ancestral de *B. glabrata* colonizou o continente africano e deu origem às espécies africanas. Os dados de Tuan e dos Santos (2007) também apoiam a hipótese de origem Neotropical para o gênero devido aos elevados níveis de variabilidade genética, principalmente em *Biomphalaria peregrina* (d'Orbigny, 1835).

1.1.3 Taxonomia de *Biomphalaria* com ênfase em *B. straminea*

O termo *Biomphalaria* significa “dois umbigos”, em referência ao aprofundamento do giro central nos dois lados da concha (PARAENSE, 1972) e foi proposto por Preston em 1910. Entretanto, esse não foi o primeiro nome sugerido para o grupo, pois Dunker em 1848 descreveu um espécime pertencente ao mesmo gênero como *Planorbis*, o qual hoje sabemos que se tratava de *B. straminea*. Diversos outros nomes foram utilizados para se referir ao grupo, como *Taphius* (Adams & Adams, 1858), *Tropicorbis* (Brown & Pilsbry, 1914), *Platytyphius* (Pilsbry,

1924), *Afroplanorbis* (Thiele, 1931) e *Australorbis* (Pilsbry, 1934) e muitos destes nomes constituíram a tribo denominada *Biomphalaria* (HUBENDICK; REES, 1955).

Além do gênero *Biomphalaria*, a tribo incluía os seguintes gêneros: *Planorbis*, *Australorbis*, *Tropicorbis*, *Taphius*, *Platytyphius* e *Syrioplanorbis* (Baker, 1945) (HUBENDICK; REES, 1955), que atualmente são considerados sinônimos júnior de *Biomphalaria*. Hubendick e Rees (1955), em seu estudo sobre a filogenia da família Planorbidae, observaram que estes planorbídeos discoidais eram morfologicamente tão semelhantes entre si, tanto na anatomia interna quanto nos caracteres conquiliológicos, que a separação em gêneros não deveria ser mantida por muito tempo. Os autores ressaltaram que os gêneros africanos *Biomphalaria* e *Afroplanorbis* eram congêneros e idênticos aos gêneros sul-americanos *Australorbis* e *Tropicorbis*, e que, portanto, poderiam ser colocados em um único gênero denominado *Biomphalaria*.

Hubendick e Rees (1955) enfatizaram ainda que não havia diferenças entre estes e os demais gêneros da tribo e que o ideal seria unir todos em um único gênero, ou manter *Biomphalaria* para os gêneros africanos e *Australorbis* e *Tropicorbis* para os sul-americanos, assim como sugeriu Wright (1959), ao solicitar a *International Commission on Zoological Nomenclature* (ICZN) uma decisão que definisse a nomenclatura do grupo. Ambos os autores afirmam que a seleção do nome correto para se referir ao grupo poderia representar uma problemática para a área médica, uma vez que alguns desses nomes eram desconhecidos pela maioria dos parasitologistas envolvidos em trabalhos com estes moluscos (HUBENDICK; REES, 1955; WRIGHT, 1959).

A decisão da ICZN a favor de *Biomphalaria* foi publicada em 1965, mas não foi muito bem aceita por todos os especialistas da época. Parodiz (1969) continuou a utilizar o termo *Taphius*, argumentando que a decisão além de arbitrária e contra a lei da prioridade, desconsiderava as recomendações da própria ICZN de conservação dos nomes com mais de 50 anos de uso geral, pois o nome *Taphius* foi adotado mais de 50 anos antes de *Biomphalaria* e utilizado por 110 anos.

B. straminea, do latim *stramineus* que significa “cor de palha”, foi originalmente descrita com base em caracteres da concha, e estão depositadas na coleção *Cuming* do *Natural History Museum*, em Londres, como procedentes da

América do Sul. A descrição original de Dunker (1848) como *Planorbis stramineus* não possui figuras e, apesar da descrição posterior (Dunker, 1850) com figuras de um espécime, não é o bastante para identificar a espécie com precisão (PARAENSE, 2001).

Assim como Dunker, Lutz (1918) descreveu *Planorbis centimentralis* do Ceará baseando-se em caracteres conquiliológicos e relatou que, apesar da semelhança com outras espécies já descritas e reportadas para o estado, como *Planorbis peregrinus* e *Planorbis stramineus*, estes espécimes diferem pelo tamanho e forma dos giros da concha. No mesmo trabalho, o autor reconhece a dificuldade em identificar as espécies do gênero *Planorbis* e a problemática da sinonímia devido à grande variabilidade e ampla distribuição do grupo, além das descrições insuficientes das espécies (LUTZ, 1918).

Mais tarde, Lutz (1928) identificou um espécime de Macaray como *Planorbis stramineus*, no entanto, como havia descrito *Planorbis centimentralis* diferenciando-a de *B. straminea*, a verdadeira identidade deste espécime não foi confirmada. Segundo Paraense (2001), a semelhança entre as conchas torna difícil a solução deste problema, e como sua presença nas outras localidades não tem sido confirmada, o nome *straminea* é aplicado usualmente ao planorbídeo morfologicamente idêntico à forma que ocorre no Ceará.

Jansen em 1944 publicou um estudo sobre a validade de *Australorbis centimentralis* (Lutz, 1918), com base em caracteres da concha e de desovas, numa análise comparativa com *B. glabrata*. Paraense e Deslandes (1955), no trabalho intitulado “Estudos sobre o *Australorbis centimentralis*”, fazem uma descrição mais detalhada, analisando características morfológicas do sistema reprodutor. Nessa época, havia um consenso sobre *Planorbis centimentralis* pertencer ao gênero *Tropicorbis*, além da possível sinonímia com *Planorbis stramineus* (PARAENSE; DESLANDES, 1955). Apesar disso, Paraense e Deslandes (1955) fizeram a inclusão de *Planorbis centimentralis* no gênero *Australorbis* e não *Tropicorbis*, baseando-se na descrição do gênero por Pilsbry e nas semelhanças dos caracteres morfológicos com a referida espécie. Os autores argumentaram que algumas diferenças observadas, como a variação no tamanho da concha, a rapidez no aumento dos giros e o comprimento do canal da espermateca podem ser devido ao tamanho e

aumento dos giros estarem sujeitos à variação no grupo e a presença de anomalias no canal da espermateca do espécime utilizado na descrição (uma vez que Pilsbry não menciona o número de espécimes analisados) ou ainda, a uma confusão entre a bolsa vaginal e a espermateca.

Na descrição de Paraense e Deslandes (1955), apesar de os aspectos histológicos serem semelhantes aos de outras espécies, alguns caracteres morfológicos eram nitidamente diferentes, o que forneceu elementos para a caracterização morfológica de *B. straminea*. Os autores diferenciaram *B. glabrata* de *B. straminea* pela presença da crista renal e, dentre as diferenças descritas, a mais notável é a presença de uma superfície externa enrugada na parede vaginal em *B. straminea*, ao invés de uma bolsa de paredes lisas (PARAENSE; DESLANDES, 1955).

Nogueira et al. (2018), ao observarem variáveis graus de enrugamento vaginal em diferentes populações de *B. straminea*, analisaram outros caracteres morfológicos em diferentes populações, além destes descritos por Paraense (1975): ausência de crista na superfície ventral do tubo renal; concha com cinco giros e abertura ovoide ou arredondada, podendo chegar até 16,5mm de diâmetro e 6mm de largura na abertura; próstata com 5 a 20 divertículos, sendo arborescentes os mais ramificados; ovoteste com cerca de 50 a 150 divertículos; canal da espermateca um pouco mais curto que o corpo da espermateca; bainha do pênis relativamente larga e varia de um pouco mais curta a mais longa que o prepúcio e a porção média da bainha peniana apresenta quase o mesmo diâmetro que a porção mais larga do canal deferente. Os autores encontraram divergências em alguns dos parâmetros em duas das quatro populações estudadas, como no canal da espermateca, sendo mais longo que o corpo da espermateca em uma das populações (NOGUEIRA et al. 2018). Além disso, foram observados valores bem inferiores aos encontrados por Paraense (1975): divertículos prostáticos variando de 11 a 13 e maior média de comprimento das conchas de 7,61mm.

Habib et al. (2018) identificaram *B. straminea* como a espécie introduzida no sul da China através da observação dos caracteres morfológicos e análise molecular utilizando os marcadores COI e 16S. Não foram observadas variações morfológicas significativas em populações de *B. straminea* de diferentes localidades e as

principais características do sistema reprodutor foram consistentes com aquelas já encontradas na literatura: enrugamento vaginal conspícuo, espermateca arredondada ou oval, divertículos do ovoteste curtos e não ramificados e bainha do pênis maior que o prepúcio. Em contrapartida, os números de divertículos prostáticos variaram significativamente nas populações do reservatório de Shenzhen e Jinkui, com uma média de $20,6 \pm 2,3$ e $10,8 \pm 0,83$ divertículos, respectivamente.

1.1.4 DNA ribossômico (DNAr) nuclear

O DNA ribossômico (DNAr) é composto por unidades repetitivas (tandem) em torno de 100 cópias por genoma e cada unidade é composta por três genes codificadores (18S, 5.8S e 28S), dois espaçadores transcritos internos (ITS) e dois externos (ETS) (COLEMAN, 2003). Os genes codificadores são as regiões mais conservadas e são muito utilizados em análises das relações filogenéticas nos grandes táxons, enquanto as regiões espaçadoras (ITS1 e ITS2) podem ser altamente variáveis e são utilizadas em análises filogenéticas entre táxons relacionados que divergiram nos últimos cinquenta milhões de anos (CARVALHO; JANNOTTI-PASSOS; CALDEIRA, 2008; ZHANG et al., 2018). As variações nas sequências das regiões espaçadoras são utilizadas na identificação de espécies ou cepas, sendo úteis em estudos de genética de populações (CARVALHO; JANNOTTI-PASSOS; CALDEIRA, 2008).

O tamanho do genoma de *B. glabrata* foi estimado em 916 Mb (GREGORY, 2003), compreendendo dezoito cromossomos haploides e foi sequenciado em 2013 (Acesso *GenBank*: APKA01000001.1 – APKA01408321) (ADEMA et al., 2017).

1.1.4.1 Espaçador transcrito interno (ITS)

O espaçador transcrito interno inclui todo o gene ITS1, 5.8S e a porção ITS2 do cistron do DNAr nuclear (Fig. 2).

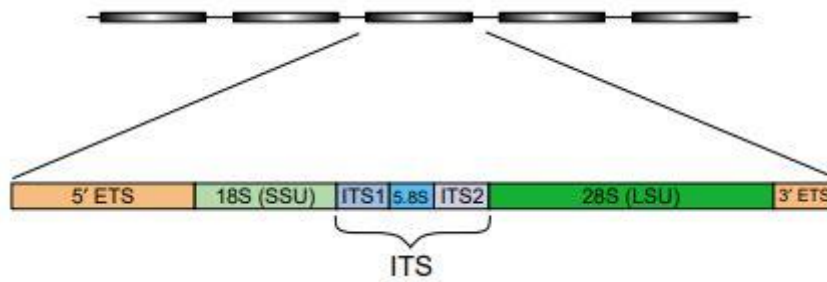


Figura 2. Diagrama ilustrando a organização dos cistrons ribossômicos nucleares (caixa cinza) de uma célula eucarionte típica (adaptado de COLEMAN, 2003).

Muitos autores tem utilizado o marcador molecular ITS para inferir a filogenia de diversos grupos de seres vivos e acredita-se que esta região tenha potencial para se tornar o próximo “DNA Barcode” em estudos com plantas (Chen et al., 2010). Coleman (2003) ressalta que a região ITS é mais informativa do que as sequências de genes dos mesmos organismos na maioria dos estudos a níveis de gênero e espécie em eucariotos.

Dentre as propriedades do espaçador transcrito interno, algumas são vantajosas para o uso na filogenética, das quais podemos citar: universalidade e simplicidade das sequências, uniformidade intragenômica e variabilidade intergenômica e, ainda, herança bi parental (ÁLVAREZ, 2003). A universalidade do ITS se deve aos inúmeros trabalhos existentes na literatura que permitem com que os dados das sequências sejam facilmente obtidos, talvez mais do que qualquer outro marcador nuclear, enquanto a sua simplicidade é devida às múltiplas cópias de DNAr no genoma, sendo mais facilmente isolados do que os demais lócus nucleares de poucas cópias, o que por sua vez, possibilita o sucesso das ampliações mesmo para aqueles com pouca experiência (ÁLVAREZ, 2003). Apesar do ITS possuir muitas repetições no genoma e isso pode estar relacionado a uma variação intragenômica, é sabido que nas sequências de ITS, assim como nas famílias multigênicas no geral, pode ocorrer uma evolução combinada, fenômeno responsável pela eliminação das variações de sequências dentro do genoma, fazendo com que restem apenas as variações de estado de caráter específicas de determinada espécie e clado, resultando assim na uniformidade intragenômica desta região (ÁLVAREZ, 2003; COLEMAN, 2003). A variabilidade intergenômica de ITS consiste nos níveis de variação das sequências que são úteis para análises a níveis

taxonômicos de espécies, gêneros e até famílias (BALDWIN, 1992; BALDWIN et al., 1995). As sequências dos espaçadores transcritos internos são herdadas bi parentalmente, ou seja, tanto do pai quanto da mãe, assim como outras sequências do genoma nuclear e diferentemente dos genomas mitocondriais. Essa propriedade em particular pode ser útil em análises de especiação híbrida e parentesco de poliplóides (BALDWIN, 1992; BALDWIN et al., 1995; KIM; JANSEN, 1994; RIESENBERG; WENDEL, 1993; WENDEL; SCHNABEL; SEELANAN, 1995).

1.1.4.2 ITS na identificação de espécies de *Biomphalaria*

Estudos apontam que os espaçadores transcritos internos do gene DNAr tem sido úteis tanto na identificação de espécies de *Biomphalaria*, quanto para análises intraespecíficas, como de espécies crípticas, seja através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (CAMBELL et al., 2000; MAVAREZ et al., 2002; VIDIGAL et al., 2000^a; VIDIGAL et al., 2000^b; VIDIGAL et al., 2004; TUAN; SANTOS, 2007) e/ou através da análise de Polimorfismo do Comprimento dos Fragmentos de Restrição (RFLP) (CALDEIRA et al., 1998; SPATZ et al., 1999; VIDIGAL et al., 1998; VIDIGAL et al., 2000^a; PEPE et al., 2009).

Spatz et al. (1999) utilizaram análises morfológicas e moleculares (PCR-RFLP) com base na região ITS e propuseram o Complexo *B. tenagophila*, constituído pelas espécies *B. tenagophila* (d'Orbigny, 1835), *Biomphalaria occidentalis* Paraense, 1981 e *Biomphalaria tenagophila guaibensis* Paraense, 1984, devido às semelhanças morfológicas e genéticas entre elas. Mais tarde, esse Complexo foi confirmado por Vidigal et al. (2004), Tuan e dos Santos (2007) após análises das sequências de ITS1 e ITS2 e Tuan et al. (2012), que utilizaram DNA Barcode.

Vidigal et al. (2000^b) sequenciaram a região ITS2 de dez espécies de *Biomphalaria* (*B. glabrata*, *B. tenagophila tenagophila*, *B. occidentalis*, *B. straminea*, *B. peregrina*, *Biomphalaria kuhniana* (Clessin, 1883), *Biomphalaria schrammi* (Crosse, 1864), *Biomphalaria amazonica* Paraense, 1966, *Biomphalaria oligoza* Paraense, 1975 e *Biomphalaria intermedia* Paraense e Deslandes, 1962) e

observaram que a sequência de cada uma dessas espécies é única. O estudo utilizou três métodos de inferência filogenética e demonstrou que o segundo espaçador transcrito interno do DNAr é útil para analisar as relações entre espécies de *Biomphalaria* (VIDIGAL et al., 2000b).

1.1.5 DNA mitocondrial (DNAm_t)

O DNA mitocondrial (DNAm_t) é uma molécula circular dupla fechada com 37 genes que codificam cerca de 13 RNAs mensageiros (RNAm), 22 RNAs de transferência (RNAt) e 2 RNAs ribossomais (RNAr), sem sequências intermediárias dentro dos genes transcritos ou sequências espaçadoras entre os genes (AVISE; ELLIS, 1986). As transições são mais comuns do que as transversões e as deleções ou adições são mais raras do que as substituições de bases (AVISE; ELLIS, 1986). O genoma mitocondrial é conhecido por conter genes e tamanho (16kb) conservados na maioria dos animais, no entanto, essas características do DNAm_t podem ser mais variáveis do que se acredita (MORITZ; DOWLING; BROWN, 1987).

O primeiro DNAm_t de moluscos a ser sequenciado foi da espécie de bivalve *Mytilus edulis*, conhecido popularmente como mexilhão-comum. O arranjo do genoma mitocondrial de *Mytilus edulis* foi determinado e apesar de conter características típicas do genoma de um metazoário, possui algumas características notavelmente incomuns, como a ausência do gene para subunidade 8 da ATPase, e a presença de 23 genes RNAt, ou seja, um a mais do que o observado em todos os outros DNAsmt de metazoários (HOFFMANN; BOORE; BROWN, 1992). Esse gene RNAt adicional parece especificar a metionina, o que por sua vez, torna o DNAm_t de *Mytilus edulis* único por conter dois genes RNAtMet (HOFFMANN; BOORE; BROWN, 1992).

O genoma mitocondrial completo de moluscos basommatóforos só foi sequenciado mais de uma década depois e pertencia a *B. glabrata* (DEJONG et al., 2004) e *B. tenagophila* (JANNOTTI-PASSOS, 2007). Com cerca de 13 mil nucleotídeos, foi o menor genoma mitocondrial registrado para moluscos até então (DEJONG et al., 2004). O DNAm_t de *B. glabrata* e *B. tenagophila* possui 22 RNAt, RNAr 12S e 16S e 13 genes que codificam proteínas, como é típico para metazoários (DEJONG et al., 2004; JANNOTTI-PASSOS, 2007).

O DNAm de *B. straminea* foi parcialmente sequenciado: os genes COI, COIII, ND2, ND3, ND4, ND5 e ND6 do DNAm foram totalmente sequenciados, enquanto o gene ND1 foi sequenciado de forma parcial (GOVEIA, 2010). Na figura abaixo, podemos ver alguns componentes do DNAm de *B. straminea*:

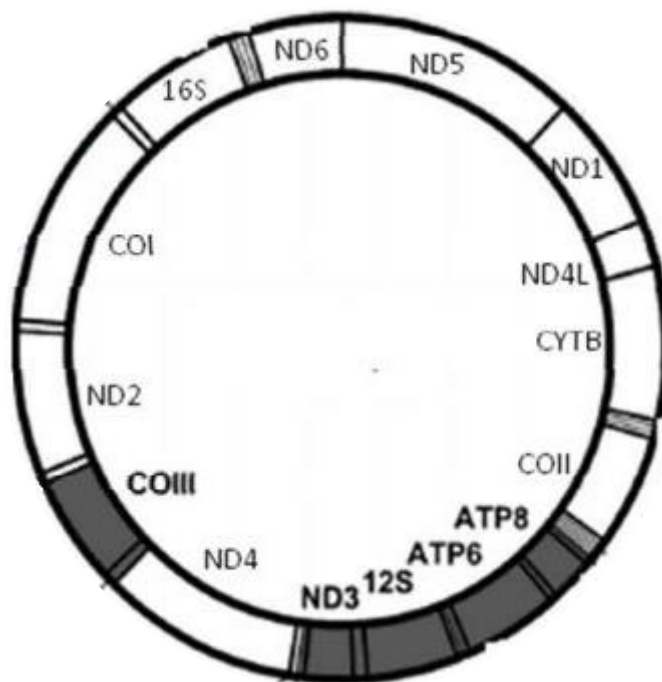


Figura 3. Ilustração mostrando os genes do DNAm de *B. straminea*. Demais componentes do DNAm foram omitidos nesta ilustração (adaptado de GOVEIA, 2010).

Goveia (2010) comparou o DNAm de *B. straminea* ao de *B. glabrata* e *B. tenagophila* e foi observado que a ordem dos genes das três espécies foi a mesma, como é demonstrado na figura 4:

12S	ND3	ND4	COIII	ND2	COI	16S	ND6	ND5	ND1	ND4L	CYTB	COII	ATP8	ATP6
12S	ND3	ND4	COIII	ND2	COI	16S	ND6	ND5	ND1	ND4L	CYTB	COII	ATP8	ATP6
	ND3	ND4	COIII	ND2	COI		ND6	ND5	ND1					

Figura 4. Ilustração mostrando a ordem gênica de *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*, de cima para baixo, respectivamente. Foram omitidos os componentes do DNAm não sequenciados (adaptado de GOVEIA, 2010).

1.1.5.1 Citocromo C Oxidase I (COI) – DNA Barcode

A subunidade I do gene Citocromo C Oxidase (COI) foi proposta para ser utilizada como código de barras de DNA (DNA Barcode), isto é, um sistema global de identificação de animais, com base na diversidade das sequências deste gene (HEBERT et al., 2003).

Um estudo analisou divergências de sequências em mais de 13.000 pares de espécies intimamente relacionadas, com representantes de 11 fillos, incluindo o filo Mollusca, e mostrou que mais de 98% das espécies congênicas diferiram geneticamente em taxas superiores a 2%, indicando que a identificação a nível de espécie pode ser obtida através das sequências de COI, exceto para o filo Cnidaria (HEBERT; RATNASINGHAM; DE WAARD, 2003). Entretanto, os genes mitocondriais, como o COI, podem não ser eficientes em casos de hibridização, introgressão e poliploides (HEBERT et al., 2003). Além disso, heranças uni parentais não apontam fluxo gênico levado pelo macho, e em alguns casos, a taxa evolutiva pode não ser rápida o suficiente para fornecer resolução ao nível de espécie (CHEN et al., 2010).

1.1.5.2 COI na identificação de espécies de *Biomphalaria*

Diversos estudos utilizam DNA Barcode para identificação de espécies de *Biomphalaria* e demonstram que este é um eficiente marcador molecular para diferenciar os hospedeiros intermediários de *S. mansoni*, assim como uma importante ferramenta para análises de espécies crípticas (CAMPBELL et al., 2000; GOVEIA, 2010; SILVA, 2012; TUAN et al., 2012; SILVA, 2013; PALASIO et al., 2017; PALASIO et al., 2019; HABIB et al., 2018; OHLWEILER et al., 2020).

Palasio et al., (2017) analisaram o potencial do DNA Barcode na identificação de sete espécies de *Biomphalaria* (incluindo dois complexos de espécies crípticas: complexo *Biomphalaria tenagophila* e complexo *Biomphalaria straminea*) do estado de São Paulo, comparando os resultados moleculares aos da taxonomia tradicional. As maiores taxas de divergência intraespecífica observadas foram de 4% (entre espécimes de *B. peregrina* e também entre espécimes de *B. glabrata*), enquanto a maior taxa interespecífica foi de 15% (entre *B. peregrina* e *B. glabrata* e *B. peregrina*

e *B. tenagophila*). As análises de sequências do Citocromo C Oxidase I permitiram identificar divergências sutis (genéticas) entre populações intraespecíficas de *Biomphalaria* que não são identificadas através da taxonomia clássica, baseada na morfologia (PALASIO et al., 2017).

Ohlweiler et al. (2020) definiram resolução e eficácia como duas das características do DNA Barcode em estudos taxonômicos de biodiversidade em espécies de *Biomphalaria* e ressaltaram que o uso deste marcador aliado às técnicas morfológicas pode auxiliar na resolução de problemas taxonômicos, tornando-se vantajoso para levantamentos malacológicos geograficamente extensos.

1.1.6. Complexo *Biomphalaria straminea*

A principal característica diagnóstica de *B. straminea* é a presença de ondulações na parede dorsal da vagina. No entanto, este enrugamento vaginal é também encontrado em outras espécies não transmissoras de *S. mansoni* (Figuras 5, 6 e 7), o que pode levar a identificações errôneas. Observando a semelhança entre *B. straminea*, *B. kuhniana* e *B. intermedia*, Paraense (1988) sugeriu agrupá-las no Complexo *B. straminea*.

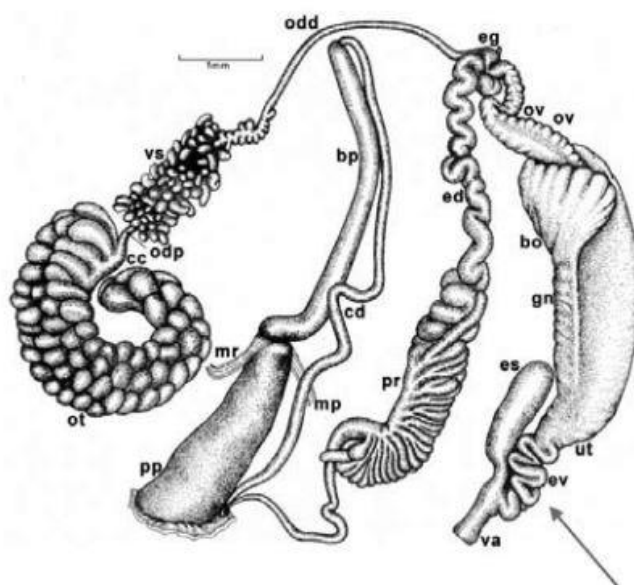


Figura 5. Ilustração do sistema reprodutor de *Biomphalaria straminea* destacando o enrugamento vaginal. Fonte: PARAENSE, 1975.

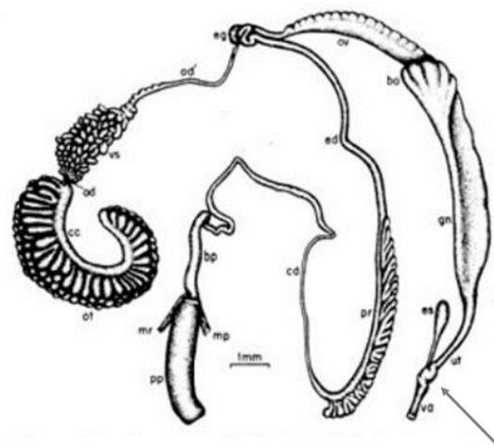


Figura 6. Ilustração do sistema reprodutor de *Biomphalaria intermedia*. Fonte: adaptado de PARAENSE, 1975.

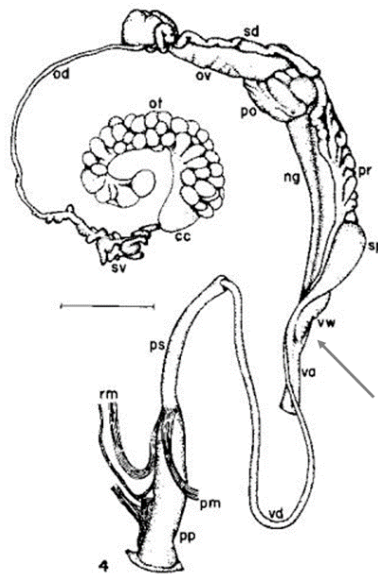


Figura 7. Ilustração do sistema reprodutor de *Biomphalaria kuhniana*. Fonte: adaptado de PARAENSE, 1988.

Este autor destacou o completo isolamento reprodutivo entre espécimes de *B. straminea* provenientes de Tangará, RN, e *B. kuhniana* da região de Tucuruí (rio Tocantins), PA, utilizando o albinismo como marcador genético, e descreveu as características diagnósticas anatômicas dessas espécies, que podem possuir variáveis graus de enrugamento vaginal: pouco desenvolvido em *B. kuhniana*, mais ou menos desenvolvido em *B. intermedia* e conspícuo em *B. straminea*, bem como o mesmo número de divertículos prostáticos: *B. kuhniana* de 4 a 9; *B. intermedia* de 7

a 15 e *B. straminea* de 9 a 18) (PARAENSE; DESLANDES, 1955 e 1962; PARAENSE, 1988).

O Complexo *B. straminea* foi confirmado por Caldeira et al. (1998) que, utilizando a técnica molecular de Polimorfismo do Comprimento dos Fragmentos de Restrição (RFLP), observou três grupos distintos, dos quais um agrupou as espécies *B. straminea* e *B. kuhniiana*. Também registraram que uma das enzimas utilizadas mostrou o mesmo perfil para *B. straminea* e *B. intermedia*.

Além das variações intra e interespecíficas, a identificação morfológica se depara com outras dificuldades como o pequeno tamanho dos moluscos, seu grau de maturidade, a falta de profissionais especializados em diferenciar essas espécies, e ainda, a variação decorrente do estado de distensão dos órgãos no momento da fixação (PARAENSE, 1975; CALDEIRA; JANNOTTI-PASSOS; CARVALHO, 2009). Com isso, os métodos moleculares se tornaram uma importante ferramenta auxiliar na identificação específica e tem sido constantemente empregados em estudos sobre a filogenia do gênero *Biomphalaria*. Monis (1999) destaca em seu estudo sobre filogenia em pesquisas parasitológicas que os métodos moleculares associados aos métodos da taxonomia clássica garantem resultados mais consistentes.

De acordo com Palasio et al. (2017), *B. straminea* e *B. intermedia* são frequentemente mal identificadas devido a semelhança morfológica entre elas. Em seu estudo sobre a identificação específica de *Biomphalaria* spp. do estado de São Paulo, foi utilizado o método “*DNA barcoding*” (subunidade I do citocromo oxidase – COI) associado às análises morfológicas para analisar as distâncias genéticas intra e interespecíficas entre *B. straminea* e *B. intermedia*, além de outras espécies de *Biomphalaria*. Foi observada variação acentuada na parede dorsal da vagina de ambas as espécies, sendo visivelmente ondulada em *B. straminea* e inchada em *B. intermedia*. Além disso, foram registrados índices de divergência genética interespecífica nove vezes maior do que a divergência intraespecífica observada, indicando que COI é um bom marcador para a identificação das espécies do complexo *B. straminea*. Entretanto, os autores destacaram que somente duas das três espécies pertencentes ao complexo foram analisadas, uma vez que *B. kuhniiana*

não ocorre no estado de São Paulo e, ainda, que não foi possível analisar um número expressivo de espécimes de *B. intermedia* devido a sua baixa densidade populacional no estado.

Silva (2012), analisando amostras da Argentina e do Uruguai, observou que os espécimes possuíam características morfológicas semelhantes à *B. straminea*, apresentando acentuado grau de enrugamento vaginal. Porém, após análises moleculares utilizando a enzima de restrição *Dde I*, foi observado que estas amostras se assemelhavam mais ao perfil de *B. intermedia* (com duas bandas) do que com *B. straminea* do Brasil (que apresentam quatro bandas), levando a uma identificação inconclusiva como *B. aff. straminea*. Vale ressaltar que algo bem semelhante ocorreu nos estudos de Paraense e Correa (1989), ao analisar indivíduos da mesma localidade no Uruguai (Espinillar) e classificá-los como *B. aff. straminea*, devido à grande semelhança morfológica entre elas.

1.1.7 Importância epidemiológica e distribuição geográfica de *B. straminea*

Das três espécies transmissoras naturais de *S. mansoni* no Brasil, *B. straminea* é a que apresenta a maior distribuição geográfica, ocorrendo em 1.586 municípios, seguida por *B. glabrata* (881 municípios) e *B. tenagophila* (602 municípios) (CARVALHO, 2020). Além disso, deve-se destacar que *B. straminea* é a mais bem adaptada a todas as variedades de clima e condições ecológicas do país, sendo extremamente tolerante as variações de fatores físico-químicos (PARAENSE, 1986). Ocorre em 24 estados: Acre, Alagoas, Amazonas, Bahia, Ceará, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, Santa Catarina, São Paulo, Sergipe, Tocantins e Roraima, além do Distrito Federal (Fig. 8) (CARVALHO et al., 2008; CARVALHO, 2020).



Figura 8. Mapa indicando a distribuição geográfica de *Biomphalaria straminea* no Brasil. Fonte: Carvalho et al., 2008.

As outras duas espécies, *B. glabrata* e *B. tenagophila*, não possuem esta ampla distribuição, ocorrendo em 16 e 10 estados, além do Distrito Federal, respectivamente (CARVALHO et al., 2008; CARVALHO, 2020). A ampla distribuição das espécies do gênero *Biomphalaria* no território brasileiro, sobretudo de *B. straminea*, contribui significativamente para expansão da esquistossomose mansoni, inclusive em áreas consideradas indenes (CARVALHO et al., 1988).

Seu potencial como espécie invasora também se deve a alta capacidade de adaptação à diferentes condições bióticas e abióticas (YIPP, 1990; HABIB et al., 2018). Yang et al. (2018), buscando analisar a distribuição de *B. straminea*, utilizaram diferentes abordagens, entre elas: comparação direta das condições climáticas e análises de sobreposição de nicho. Além disso, os autores analisaram impactos bioclimáticos que foram utilizados na predição da distribuição potencial de *B. straminea* em escala global. As características climáticas mais relevantes para a ocorrência de *B. straminea* foram temperatura média anual, isothermalidade e sazonalidade da temperatura (YANG et al., 2018). Foi observado que nas condições climáticas atuais, *B. straminea* deve estar restrita principalmente às regiões tropicais

e subtropicais, incluindo América do Sul, América Central, África Subsaariana e Sudeste Asiático (YANG et al., 2018).

Mudanças de nicho ocorreram durante as invasões de *B. straminea* nas Américas e na China, com as populações introduzidas ampliando seus habitats para regiões subtropicais, nas quais a temperatura média anual é mais baixa (YANG et al., 2018). Os autores relataram que fatores bioclimáticos desempenharam um papel importante na invasão desses locais e que *B. straminea* tem um potencial significativo para se espalhar ainda mais como espécie exótica.

Apesar de apresentar as menores taxas de infecção por *S. mansoni*, *B. straminea* é responsável pela manutenção de altas taxas de infecção humana em algumas localidades do Nordeste (JANSEN, 1946; PELLON; TEIXEIRA, 1950). Barbosa e Coelho (1954) registraram taxas de infecção natural inferiores a 1% em *B. straminea* de Pernambuco, enquanto Jansen (1946) observou taxas elevadas de infecção por *S. mansoni* em *B. straminea* do município de Catende (PE), com percentual de até 18,45 e taxa de infecção humana de 53,1%. As altas taxas encontradas podem estar atribuídas à uma maior concentração de moluscos em regiões poluídas por dejetos humanos (JANSEN, 1946). Barbosa e Figueiredo (1970), Souza, Jannotti-Passos e Freitas (1995), Souza et al. (1981), Almeida e Mendonça (1986), Dias, Ueta e Gueraldo (1987), Fernandez e Pieri (2001) e Fernandez e Thiengo (2002) observaram índices de infecção experimental variando entre 0 e 48% em populações procedentes do Alagoas, Ceará, Paraíba, Goiás, Piauí, Pernambuco e Rio Grande do Norte.

Dias, Ueta e Gueraldo (1987) relataram baixa suscetibilidade de *B. straminea* a diferentes linhagens de *S. mansoni* e taxas de mortalidade inferiores às registradas para os demais hospedeiros intermediários. Com relação a infecção humana, há registros de taxas superiores a 50% em regiões onde o único vetor conhecido é *B. straminea*, ressaltando a importância epidemiológica desta espécie, principalmente na região Nordeste do Brasil (PELLON; TEIXEIRA, 1950; PARAENSE; CORREA, 1989; FERNANDEZ; PIERI, 2001).

1.2. Justificativa

A existência do Complexo *B. straminea*, a variabilidade nos caracteres morfológicos específicos, os diferentes índices de suscetibilidade de *B. straminea* ao *S. mansoni* e sua ampla distribuição geográfica indicam a necessidade de estudos que envolvam a análise morfo-molecular de vários espécimes.

A correta identificação específica dos hospedeiros intermediários de parasitos de interesse médico-veterinário é imprescindível, seja inicialmente para discriminar as espécies transmissoras daquelas não transmissoras, seja posteriormente para identificar as localidades com maior importância epidemiológica, além de subsidiar a tomada de decisões sobre medidas de monitoramento e controle mais adequadas de doenças parasitárias como a esquistossomose.

O Laboratório de Malacologia do Instituto Oswaldo Cruz, enquanto Referência Nacional para Esquistossomose-Malacologia para o Ministério da Saúde desde 2007 possui um Moluscário (Coleção Viva) com populações de diversos gastrópodes continentais, principalmente as espécies transmissoras de *S. mansoni*, além da guarda da Coleção de Moluscos do Instituto Oswaldo Cruz (CMIOC). Ambas as coleções constituem excelente fonte tanto de material, quanto de dados necessários ao desenvolvimento deste estudo.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo geral

- Avaliar a variabilidade dos caracteres morfo-moleculares para o diagnóstico taxonômico de *B. straminea*, a partir da análise comparada de diferentes populações procedentes das cinco regiões do Brasil.

1.3.2 Objetivos específicos

- Verificar as características moleculares dos mesmos espécimes investigados morfológicamente, por meio do sequenciamento e análise comparativa de marcadores utilizados como *barcoding* em moluscos;

- Identificar possíveis clados monofiléticos, a partir das populações estudadas, e as relações filogenéticas entre estes;

- Correlacionar os dados morfológicos e moleculares de espécimes de *B. straminea* de populações das cinco regiões do Brasil.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Obtenção e processamento das amostras

Foram obtidas amostras de diferentes colônias mantidas no Moluscário do Laboratório de Referência Nacional para Esquistossomose/Malacologia do Instituto Oswaldo Cruz (LRNEM-IOC). Esta Coleção Viva foi criada na década de 1970 e conta atualmente com 80 populações de várias espécies de moluscos, principalmente do gênero *Biomphalaria*, sendo mais de 20 colônias de *B. straminea*. Os espécimes são mantidos em aquários de vidro com água filtrada sem traços de substâncias químicas e um fragmento de folha de isopor para facilitar a postura e a coleta das desovas (Fig. 9). São alimentados com alface, podendo esta ser desidratada para os juvenis ou fresca para os adultos. Além da alimentação, os aquários possuem um substrato constituído de argila peneirada (10 partes) enriquecida com carbonato de cálcio (1,5 partes) e farinha de ostra (2 partes) como complemento alimentar.



Figura 9. Colônia de *Biomphalaria straminea* mantida no Moluscário do Laboratório de Referência Nacional para Esquistossomose – Malacologia (LRNEM). Fonte: Autoral.

Os exemplares foram coletados em anos diferentes e variaram entre cinco a mais de 40 anos, sem recebimento de exemplares do campo ao longo do tempo. Todos os espécimes obtidos eram adultos, sendo selecionados preferencialmente os maiores espécimes disponíveis, para minimizar a influência potencial da variação morfológica relacionada à maturidade sexual ou indivíduos muito jovens.

Foram selecionadas 10 colônias de *B. straminea* procedentes de oito estados do Brasil: Região Centro-Oeste: Goiás (Minaçu e Uruaçu); Região Sudeste: Minas Gerais (Itapagipe) e Rio de Janeiro (Rio de Janeiro); Região Norte: Pará (Parauapebas e Sapucaia); Região Sul: Paraná (Londrina) e Rio Grande do Sul (Pelotas); e Região Nordeste: Piauí (Picos) e Sergipe (Nossa Senhora de Lourdes). Foram selecionados cinco espécimes de *B. straminea* de cada localidade, totalizando cinquenta indivíduos.

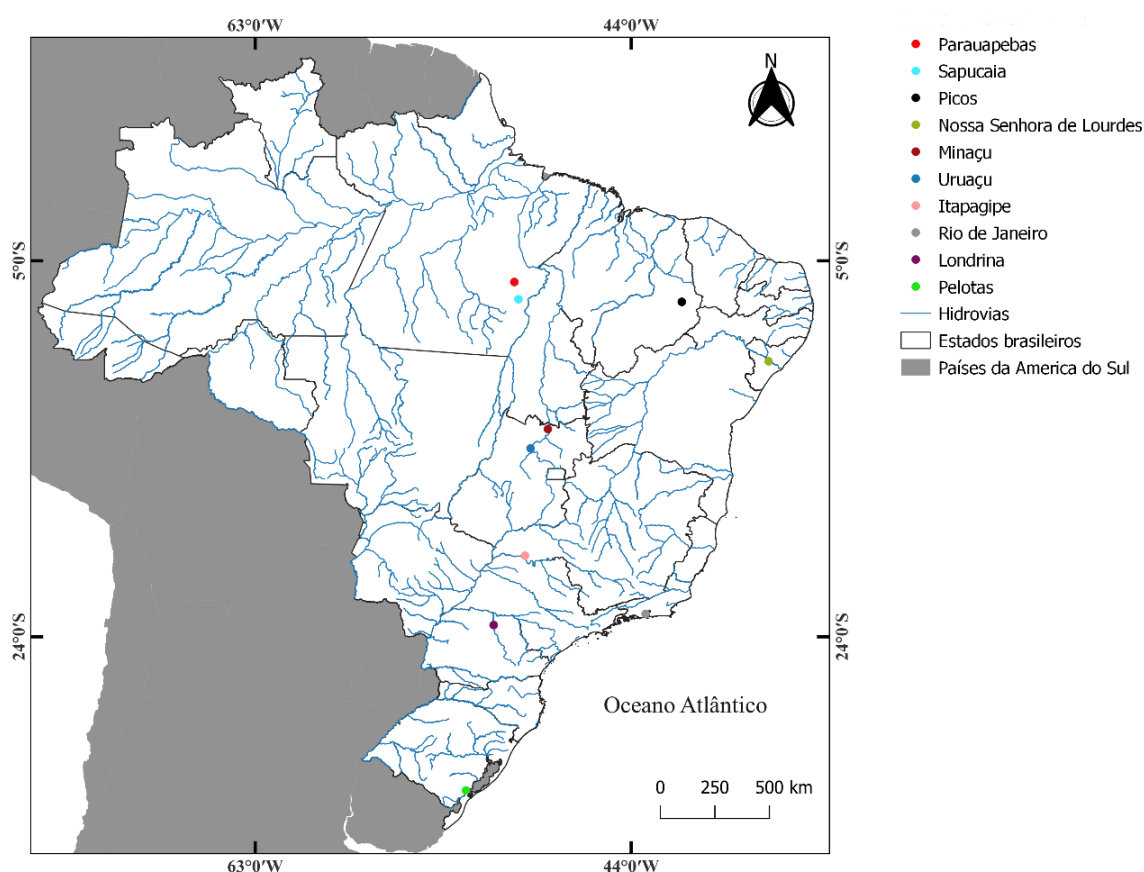


Figura 10. Mapa do Brasil com as dez localidades de *Biomphalaria straminea* analisadas procedentes da Coleção Viva de moluscos do Laboratório de Referência Nacional para Esquistossomose- Malacologia do Instituto Oswaldo Cruz - LRNEM-IOC.

Para a taxonomia clássica, a correta fixação dos exemplares é essencial, bem como garantir que os moluscos estejam anestesiados da forma adequada, pois do contrário, os espécimes podem se contrair no momento da fixação e dificultar a etapa de retirada da parte mole das conchas, a dissecação e a mensuração das estruturas (BRASIL, 2008).

O anestésico adequado para espécies de *Biomphalaria* e demais gastrópodes límnicos denomina-se pentobarbital sódico, mas é comercializado sob o registro de Nembutal ou Hypnol (BRASIL, 2008). Neste estudo foi utilizado o Hypnol e a concentração usada foi de 1%. Os espécimes foram imersos na solução anestésica até o completo relaxamento dos tecidos (aproximadamente seis horas), que foi confirmado com auxílio de pinças. Os exemplares foram imersos em água a 70°C durante 40 segundos (Figuras 11A e 11B) e, em seguida, imersos em água a temperatura ambiente para que as amostras fossem resfriadas.

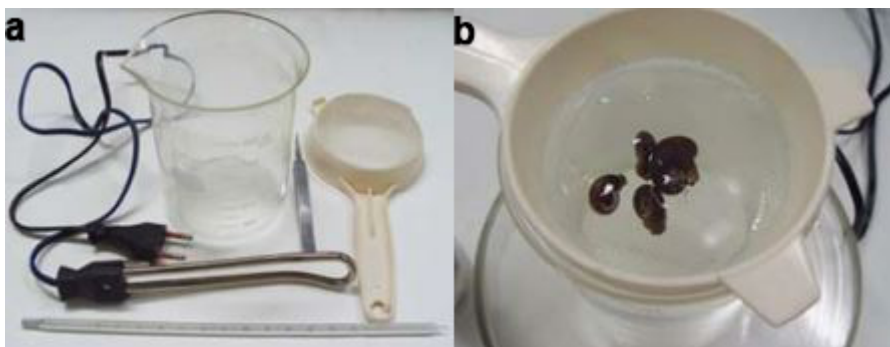


Figura 11. A. Material necessário à técnica de fixação de moluscos (BRASIL, 2008). B. Exemplares de *Biomphalaria* sp. anestesiados em Hypnol a 1% e submersos em água a 70°C (BRASIL, 2008).

Vale ressaltar que essas etapas devem ser seguidas à risca para que não ocorra o cozimento da hemolinfa e dos tecidos dos moluscos, o que pode dificultar a dissecação (BRASIL, 2008). A parte mole de cada espécime foi retirada da concha pelo pé, com auxílio de pinças de pontas finas e com os exemplares imersos em água, como é demonstrado na figura 12 (A-D):



Figura 12. A-D. Etapas da retirada de *Biomphalaria* sp. da concha (BRASIL, 2008).

A parte mole foi fixada em solução Raillet-Henry para análise morfológica (BRASIL, 2008) e as conchas foram lavadas e colocadas para secar a temperatura ambiente.

2.2 Análise das amostras

2.2.1 Morfologia da concha e sistema reprodutor

Os espécimes foram dissecados sob estereomicroscópio (Fig. 13A-B). As principais estruturas do sistema reprodutor (feminino e masculino) foram desenhadas com o auxílio de câmara clara e as medidas foram obtidas manualmente com régua a partir dos desenhos.



Figura 13. A. Espécime de *B. straminea* anestesiado em Hypnol a 1%, fixado e pronto para ser dissecado sob estereomicroscópio. B. Dissecção de exemplar de *B. straminea* sob estereomicroscópio e com auxílio de placa de Petri e pinças de pontas finas.

Para cada exemplar, 16 caracteres morfológicos foram analisados: comprimento (1) e largura da base (2) e do ápice (3) do prepúcio, comprimento (4) e largura (5) da bainha do pênis, largura máxima do canal deferente (6), número de divertículos prostáticos (7), comprimento (8) e número de ramos do divertículo mais basal (9), comprimento da região basal da próstata entre o primeiro e último divertículo (10), comprimento entre a abertura feminina e a inserção da espermateca (11), comprimento (12) e largura (13) da espermateca, comprimento do canal da espermateca (14), comprimento da área do enrugamento vaginal (15) e número de curvas do enrugamento vaginal (16). Também foram analisadas 8 proporções entre esses caracteres: comprimento da bainha do pênis e do prepúcio (1); largura máxima do canal deferente e da bainha peniana (2); largura da base e do ápice do prepúcio (3); comprimento da área dos divertículos e quantidade de divertículos prostáticos (4); comprimento e largura da espermateca (5); comprimento da espermateca e do canal da espermateca (6); comprimento do enrugamento vaginal e quantidade de curvas (7); comprimento do enrugamento vaginal e da área dos divertículos prostáticos (8). As estruturas do sistema reprodutor analisadas estão ilustradas na Figura 14:

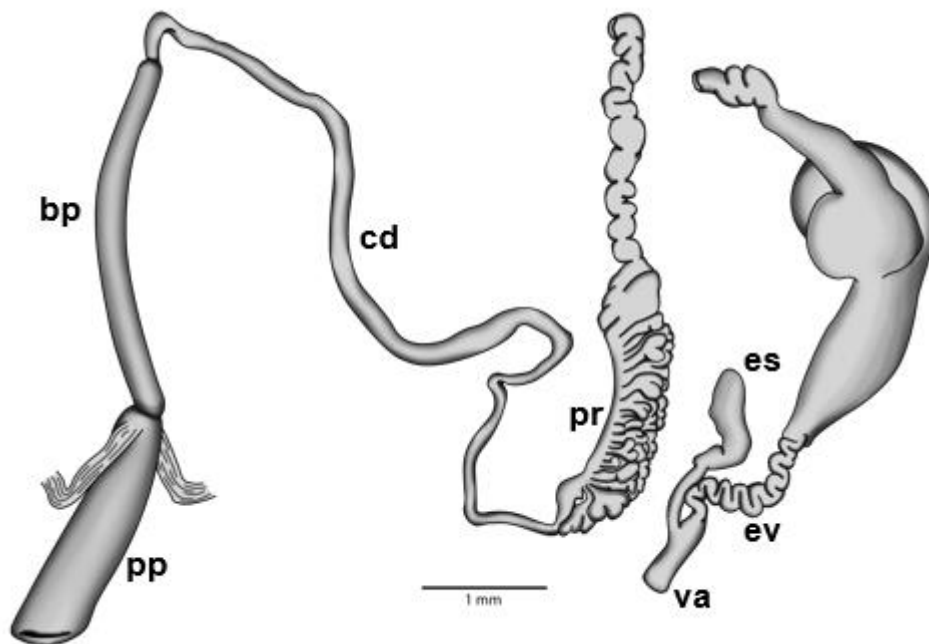


Figura 14. Esquema parcial do sistema reprodutor de *Biomphalaria straminea* ilustrando as principais estruturas analisadas no estudo. Abreviações: **pp**: prepúcio; **bp**: bainha do pênis; **cd**: canal deferente; **pr**: próstata; **es**: espermateca; **ev**: enrugamento vaginal; **va**: vagina.

As conchas foram fotografadas em estereomicroscópio (Leica M205C) com câmera digital acoplada (DMC2900) e foram medidas com paquímetro digital (Fig. 15).



Figura 15. Medida da altura da concha de *Biomphalaria straminea* sendo aferida utilizando paquímetro digital.

Para as análises conquiliológicas, foram considerados dois parâmetros (Fig. 16): diâmetro e altura da concha (Paraense, 1988). Foram analisados o tamanho de cada exemplar e posteriormente a média de cada localidade.

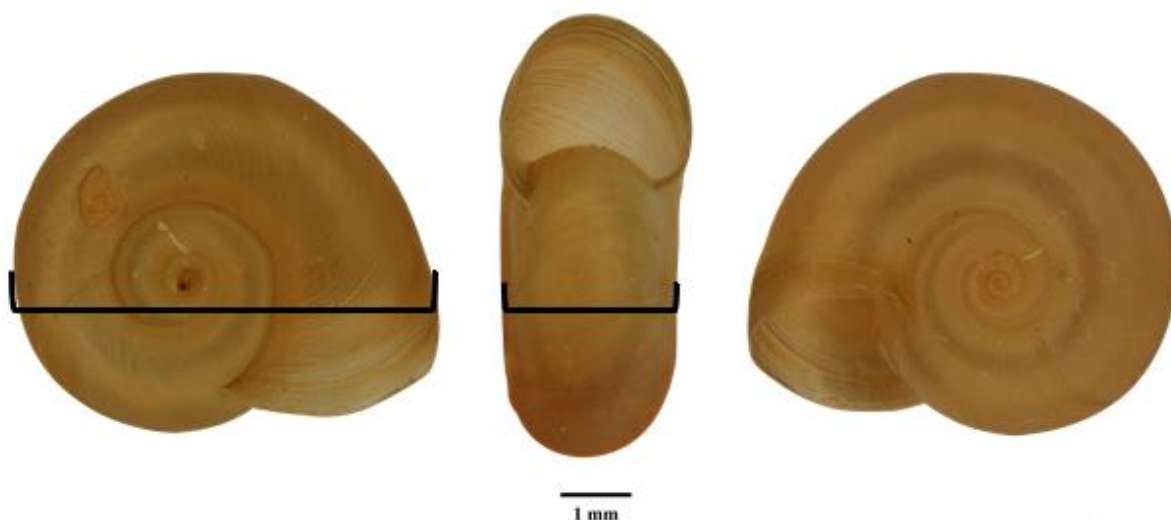


Figura 16. Foto da concha de *Biomphalaria straminea* mostrando como foram aferidas as medidas de diâmetro (à esquerda) e altura (centro). Fotografia de Eduardo Cinilha.

2.2.2 Análises moleculares

2.2.2.1 Extração, amplificação por PCR e sequenciamento do DNA

O DNA de cinco exemplares de cada população, totalizando cinquenta indivíduos, foi extraído de parte do molusco (mufla/pé) retirada antes da fixação. Cada amostra de tecido foi acondicionada individualmente em frasco eppendorf e mantido congelado a -20°C para ser processado utilizando o kit da Qiagen “DNA Easy Blood and Tissue”. A extração de DNA foi realizada de acordo com o Procedimento Operacional Padrão (POP) do LRNEM-IOC e com o protocolo sugerido pelo fabricante.

A partir do DNA obtido, a técnica de PCR foi utilizada para amplificação da subunidade I do DNA mitocondrial do citocromo c oxidase, que possui aproximadamente 710 pares de base, utilizando os primers *forward* (F): LCO1490: (5' -GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG - 3') e *reverse* (R) HCO2198: (5' -TAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA - 3') (FOLMER et al., 1994) e da segunda

região espaçadora transcrita interna do gene RNA ribossomal, com 460 pares de base, utilizando o primer *forward* (F) ITS2 (5' -CGTCCGTCTGAGGGTCGGTTTGC - 3') (VIDIGAL et al., 2000b) e o *reverse* (R) ETTS1 (5' - TGCTTAAGTTCAGCGGGT- 3') (KANE; ROLLINSON, 1994).

A PCR foi executada em duas misturas de 25 µL de reagentes contendo uma concentração final de 1X Ludwig 10 x buffer, 0,2 µM de dNTP, 2,5 µM Ludwig mgCl₂, 0,2 µM de cada primer, 1 µM de Taq Ludwig Hot Start, 1 µL do DNA extraído de cada amostra, e um volume total de reação de 50 µL.

Para a termociclagem da reação, foram utilizados dois termocicladores (Veriti 96 Well Thermal Cycler / Bio-Rad MyCycler Thermal Cycler), conforme disponibilidade no LRNEM-IOC, e os ciclos da PCR foram os seguintes para a região ITS2: 1 ciclo de 5 minutos a 95°C, 1 ciclo de 45 segundos a 95°C, 32 ciclos de 1 minuto a 60°C, 32 ciclos de dois minutos a 72°C, 1 ciclo de 5 minutos a 72°C e 1 ciclo de 4 minutos a 20°C (adaptado de Vidigal et al., 1998). Para a região COI, as condições da termociclagem da reação foram: 1 ciclo de 5 minutos a 95°C, 1 ciclo de 1 minuto a 95°C, 30 ciclos de 1 minuto a 52°C, 30 ciclos de 1 minuto a 72°C, 1 ciclo de 5 minutos a 72°C e 1 ciclo de 4 minutos a 20°C (adaptado de Hayes; Cowie; Thiengo, 2009).

O produto da PCR foi analisado em gel de agarose a 1,5% com brometo de etídio, por eletroforese, e visualizado em transiluminador UV (Fig. 17), com o intuito de verificar se as regiões de interesse haviam sido amplificadas com sucesso.

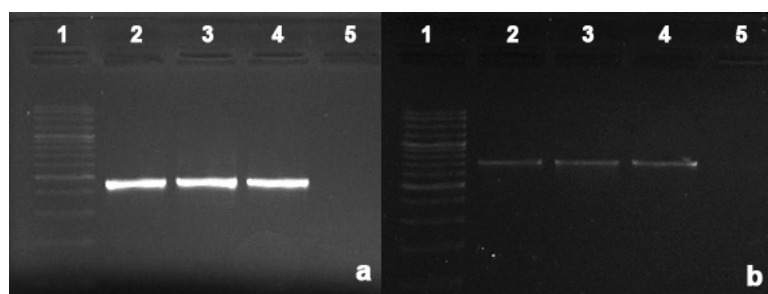


Figura 17. Gel de agarose contendo produtos das reações de PCR visualizados em transiluminador UV. A. Gene ITS2. B. Gene COI. Amostras (ambos os genes): 1: Padrão de peso molecular; 2: Uruaçu/GO 6; 3: Itapagipe/MG 2; 4: Controle positivo; 5: Controle negativo.

O produto da reação de PCR foi purificado utilizando o kit “GFX PCR DNA and Gel Band Purification” da *GE Healthcare*, sendo o produto obtido submetido para sequenciamento na Plataforma Genômica – Sequenciamento de DNA - RPT01A (Rede de Plataformas Tecnológicas FIOCRUZ). O sequenciamento cíclico das amostras foi realizado em ambas as direções com o kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems) e analisado por eletroforese capilar no ABI 3730XL (Applied Biosystem). Erros e ambiguidades foram editados manualmente no programa “Seqman” (versão 7) (Fig. 18) (DNASStar, INC).

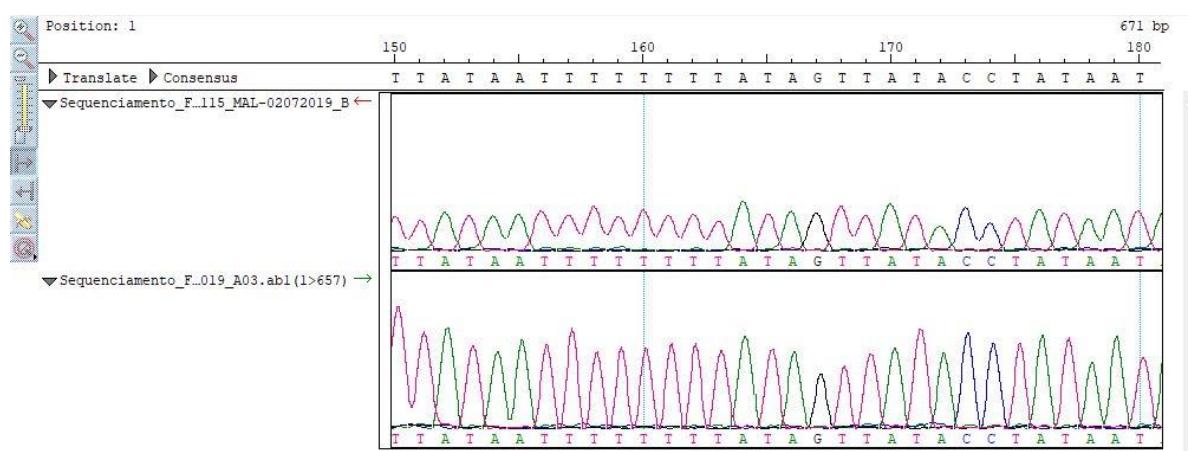


Figura 18. Eletroferograma de uma das seqüências COI editado manualmente no software Seqman versão 7.

2.2.2.2 Seleção de seqüências e grupo externo

Foram selecionadas todas as seqüências com boa resolução e com mais de 600pb para COI e 380pb para ITS2. O comprimento final das seqüências variou de 602 a 709pb no COI, e de 382pb a 451pb no ITS2. Ao todo, foram 89 seqüências para as análises independentes dos genes, sendo 50 de COI e 39 de ITS2.

Além das novas seqüências, foram incluídas no estudo seqüências de *B. straminea* disponíveis no *GenBank*, através da ferramenta online “Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)”. Foram encontradas cento e quatro seqüências de *B. straminea* do *GenBank*, sendo noventa e seis seqüências do gene COI e oito de

ITS2. No entanto, após análise mais detalhada dessas sequências e para que não houvesse perda de sítios informativos, optou-se pela não utilização de grande parte destas sequências. Além disso, foram incluídas todas as sequências de *B. kuhniiana* e *B. intermedia* disponíveis para ambos os genes.

Para o grupo externo, foram utilizadas quinze sequências de oito táxons, incluindo diferentes espécies de *Biomphalaria*, além de espécies de *Helisoma* (grupo irmão). A adição de mais táxons como grupo externo influencia diretamente as relações do grupo interno, podendo alterar completamente as relações filogenéticas entre os indivíduos do grupo de interesse (NIXON, CARPENTER, 1993; PHILIPPE et al., 2011; BOROWIEC et al., 2017). Além disso, a seleção de um grupo externo apropriado é crucial para inferência filogenética, confiabilidade e resolução das análises, assim como as topologias das árvores (HAYES; COWIE; THIENGO, 2009), uma vez que os grupos externos são utilizados para fornecer informações sobre a direção de transformação de uma característica particular (BANDONI; MULVEY; LOCKER, 1995). Assim sendo, a escolha de *Helisoma* sp. como grupo externo foi feita com base nos estudos de Hubendick e Rees (1955), Bandoni, Mulvey e Locker (1995), Sullivan et al. (1995) e Dejong et al. (2001), que indicaram que os gêneros *Biomphalaria* e *Helisoma* são intimamente relacionados, provavelmente sendo os planorbídeos mais próximos. *H. trivolvis*, por exemplo, tem a maior parte de suas sequências alinhadas às sequências de *Biomphalaria* (DEJONG et al., 2001).

Foram selecionadas duas sequências provenientes de seis espécies de *Biomphalaria*: *B. glabrata*, *B. tenagophila*, *B. oligoza*, *B. peregrina*, *B. schrammi* e *B. amazonica* para o gene ITS2 e *B. glabrata*, *B. tenagophila*, *B. oligoza*, *B. peregrina*, *B. schrammi* e *B. occidentalis* para o gene COI. Esta última espécie foi incluída por não haver sequências de *B. amazonica* disponíveis para este marcador molecular.

As sequências de *Helisoma* spp. foram selecionadas conforme disponibilidade no *GenBank*, sendo duas de *H. duryi* e uma de *H. trivolvis* para ITS2 e duas de *H. trivolvis* e duas identificadas como *Helisoma* sp. para COI. Todas as sequências do *GenBank* utilizadas nas análises filogenéticas estão descritas no Anexo 1, com seus respectivos códigos de acesso.

2.2.2.3 Alinhamento, análises filogenéticas, divergência genética e rede de haplótipos

As sequências COI foram alinhadas no servidor online TranslatorX (ABASCAL; ZARDOYA; TELFORD, 2010) utilizando o algoritmo para alinhamento de múltiplas sequências ClustalW (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994). As sequências ITS2 foram alinhadas usando o algoritmo MAFFT online, versão 7 (KATO; ROZEWICKI; YAMADA, 2019), com o refinamento iterativo E-INS-i selecionado e todos os outros parâmetros no modo padrão. Os modelos de substituição de nucleotídeos foram selecionados usando o *Bayesian Information Criterion* (BIC), executado no jModelTest versão 2.1.10 (DARRIBA et al., 2012). As sequências de *B. straminea* geradas neste estudo, as localidades dos espécimes e os códigos provisórios do *Genbank* estão descritos no Anexo 2.

Sequências de consenso dos genes COI e ITS2 foram concatenadas para a Inferência Bayesiana (IB) no MrBayes 3.2.7 (RONQUIST et al., 2012), incluindo trinta e oito sequências de cada gene, totalizando setenta e seis sequências (COI: ON704917-54; ITS2: ON707165-202) previamente identificadas como *B. straminea* como parte deste trabalho. A execução da IB foi configurada para quatro cadeias simultâneas, em duas corridas independentes com diferentes árvores aleatórias, consistindo em quatro cadeias de Markov, que foram amostradas a cada 100 gerações ao longo de 10.000.000 gerações. Os valores de suporte dos ramos foram determinados pelas Probabilidades Bayesianas Posteriores (PBPs) das árvores amostradas após a remoção manual dos primeiros 10% das árvores como burn-in. As árvores foram visualizadas no FigTree 1.4.4 (RAMBAUT, 2012) e editadas no Adobe Photoshop 2021 Portable. O Tamanho Efetivo da Amostra (ESS) foi estimado no Tracer v1.7 (RAMBAUT et al., 2018).

As divergências genéticas intra e interespecíficas dos genes COI e ITS2 foram calculadas no software MegaX (KUMAR et al., 2018) com base no modelo Kimura 2 Parâmetros (KIMURA, 1980). O software DnaSP versão 6.12.03 (ROZAS et al., 2017) foi utilizado para calcular o número de haplótipos (h) e mutações (E_{ta}), bem como a diversidade de haplótipos (h_d) e nucleotídeos (π). A rede de haplótipos foi gerada no software NETWORK versão 10.2.0.0 (Fluxus Technology Ltd.) e editada

no programa Adobe Photoshop 2021 Portable. Nesta análise, foram combinadas 59 sequências COI de *B. straminea*, sendo 50 deste trabalho: ON704917-ON704954; ON714049-ON714060 e 9 disponíveis no *GenBank*: KF926184-91 e KF926195 (Anexo 3) de 14 locais em diferentes regiões do Brasil. Para a rede de haplótipos complementar, além das sequências anteriormente citadas, foram utilizadas as mesmas sequências de *B. kuhniiana* disponíveis no *Genbank* e incluídas na análise filogenética do gene COI (N = 6 KJ137284-88 e KJ137290).

3. RESULTADOS

3.1 Morfologia da concha e sistema reprodutor

A morfologia do sistema reprodutor foi analisada nos cinco espécimes obtidos de todos os locais de estudo, exceto o de Nossa Senhora de Lourdes/SE. Infelizmente, não foi possível mensurar as estruturas morfológicas nesses espécimes, embora tenhamos observado pelo exame qualitativo que o enrugamento vaginal de um deles era muito discreto e com aspecto inchado, bem distinto dos demais indivíduos analisados (Fig. 19). Além disso, um dos espécimes de Sapucaia/PA, que foi analisado apenas molecularmente, apresentava apenas três divertículos prostáticos (Fig. 20).

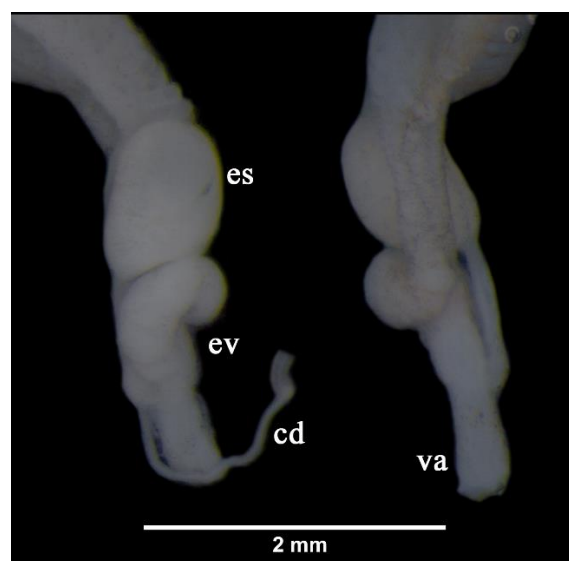


Figura 19. Fotografia de parte do sistema reprodutor de *Biomphalaria straminea* mostrando a estrutura do enrugamento vaginal do espécime 7 de Nossa Senhora de Lourdes/SE (Fotografia de

Eduardo Cinilha). Abreviaturas: **es**: espermateca; **ev**: enrugamento vaginal; **cd**: canal deferente; **va**: vagina.

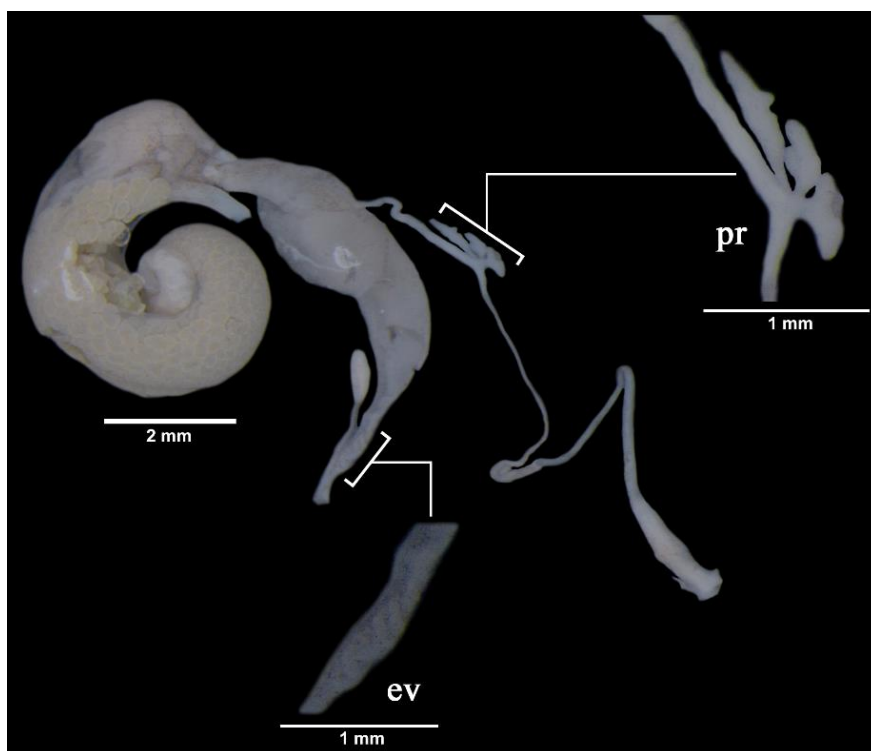


Figura 20. Fotografia do sistema reprodutor completo do espécime 8 de *Biomphalaria straminea* proveniente de Sapucaia/PA, mostrando os três divertículos prostáticos, bem como o enrugamento vaginal típico da espécie (Fotografia de Eduardo Cinilha). Abreviaturas: **pr**: próstata; **ev**: enrugamento vaginal.

Todos os 16 caracteres morfológicos analisados apresentaram variações entre os indivíduos da mesma localidade e entre as diferentes localidades (Anexo 4), exceto de Pelotas, em que todos os cinco exemplares possuíam 11 divertículos prostáticos. Foi observada ampla variação no grau de enrugamento vaginal, principal estrutura diagnóstica de *B. straminea*, com os indivíduos tendo apresentado de 0 a 8 curvas na parede dorsal da vagina, enquanto que nos espécimes de um mesmo local, como no município de Sapucaia/PA, o enrugamento variou de discreto, isto é, sem curvas definidas, até conspícuo, com seis curvas (Fig. 21). Os espécimes de Londrina/PR apresentaram a menor variação no grau de enrugamento vaginal, com quatro dos espécimes contendo quatro curvas e um espécime com três curvas (Fig. 22).

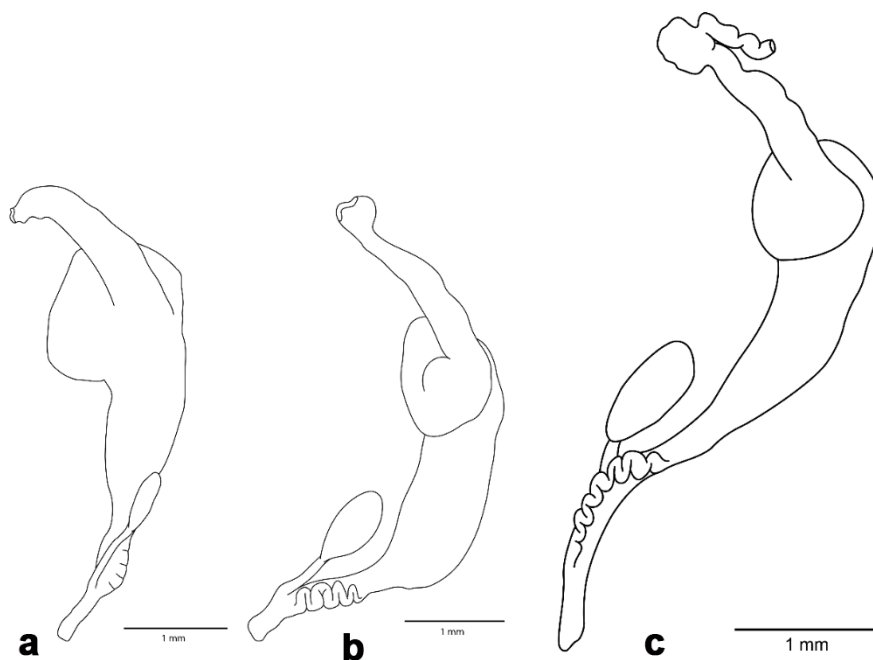


Figura 21. Parte do sistema reprodutor de *Biomphalaria straminea* mostrando a variação intraespecífica no grau de enrugamento vaginal nos exemplares provenientes de Sapucaia/PA (a, b e c são os espécimes 1, 2 e 5, respectivamente).

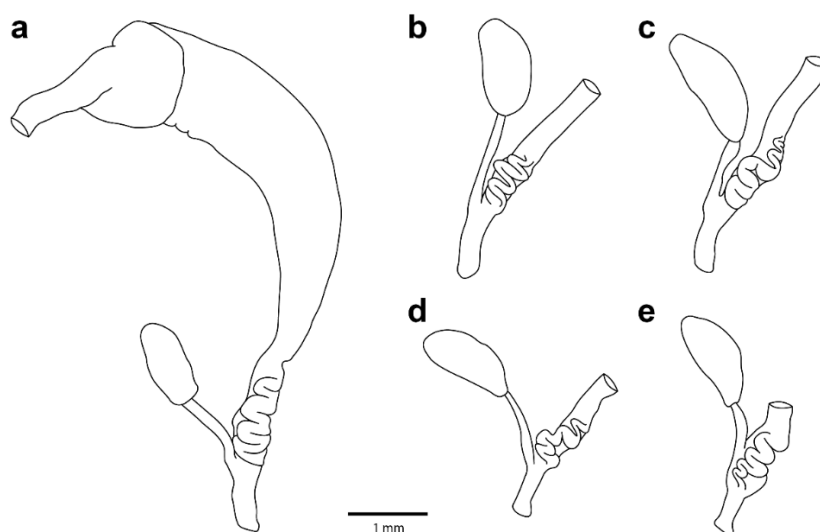


Figura 22. Diagrama de parte do sistema reprodutor de *Biomphalaria straminea* mostrando a relativa ausência de variação intraespecífica no grau de enrugamento vaginal observado nos espécimes de Londrina/PR, (a, b, c, d, e e são os espécimes 9, 3, 2, 5 e 6, respectivamente).

Os espécimes de Uruaçu/GO apresentaram a maior média de curvas no enrugamento vaginal (6 ± 2) e área do enrugamento mais comprida ($1,07 \pm 0,17$), assim como dois espécimes de Itapagipe/MG e Parauapebas/PA (Fig. 23).

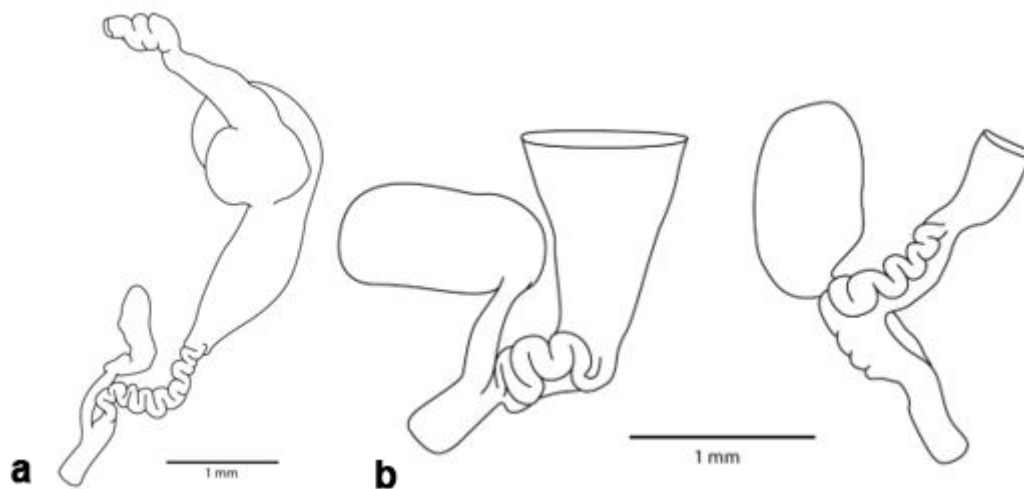


Figura 23. Desenhos de parte do sistema reprodutor de *Biomphalaria straminea* mostrando as estruturas da parede dorsal da vagina e enrugamento vaginal, (a) espécime 3 de Parauapebas/PA com oito curvas e (b) espécime 1 de Itapagipe/MG com oito curvas).

Outra característica importante que apresentou variação foi a quantidade de divertículos prostáticos, como nos espécimes do município de Uruaçu/GO, que continham de 7 a 14 divertículos (Fig. 24). Esta mesma variação (7–14) foi observada entre as diferentes localidades e em indivíduos aproximadamente do mesmo tamanho.

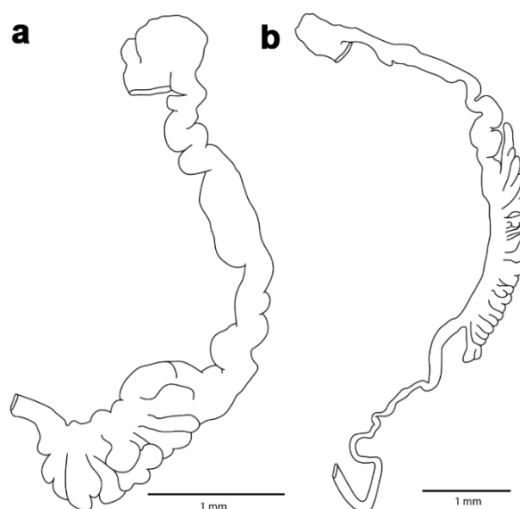


Figura 24. Diagrama da próstata de *Biomphalaria straminea* mostrando a variação intraespecífica do número de divertículos prostáticos nos espécimes de Uruaçu/GO: (a) espécime 5, com 7 divertículos e (b) espécime 2, com 14 divertículos.

Também foram observadas variações nos índices de proporção analisados (Anexo 5), como entre o comprimento do canal e do corpo da espermateca e entre a largura da bainha peniana e do canal deferente. O canal da espermateca foi mais curto que o corpo da espermateca em quase todos os espécimes, exceto nas localidades do Rio de Janeiro/RJ e em alguns indivíduos de Minaçu/GO, Uruaçu/GO, Sapucaia/PA e Londrina/PR. A largura da bainha peniana foi maior que a porção média do canal deferente na maioria dos espécimes, com exceção das localidades de Pelotas/RS e Parauapebas/PA. Em contrapartida, não foram observadas variações nas relações entre o comprimento da bainha do pênis e do prepúcio, com a bainha peniana maior que o prepúcio, e entre a largura da base e do ápice do prepúcio, com a base do prepúcio sempre mais larga que o seu ápice em todos os espécimes.

Foi observada variação no diâmetro e na altura das conchas (Anexo 6), com os espécimes da localidade de Pelotas/RS tendo apresentado as maiores médias, tanto de diâmetro (7,82mm) como de altura (3,23mm), enquanto as menores médias foram da localidade de Sapucaia/PA, sendo 4,79mm de diâmetro e 2,11mm de altura (Figs. 25A e B).

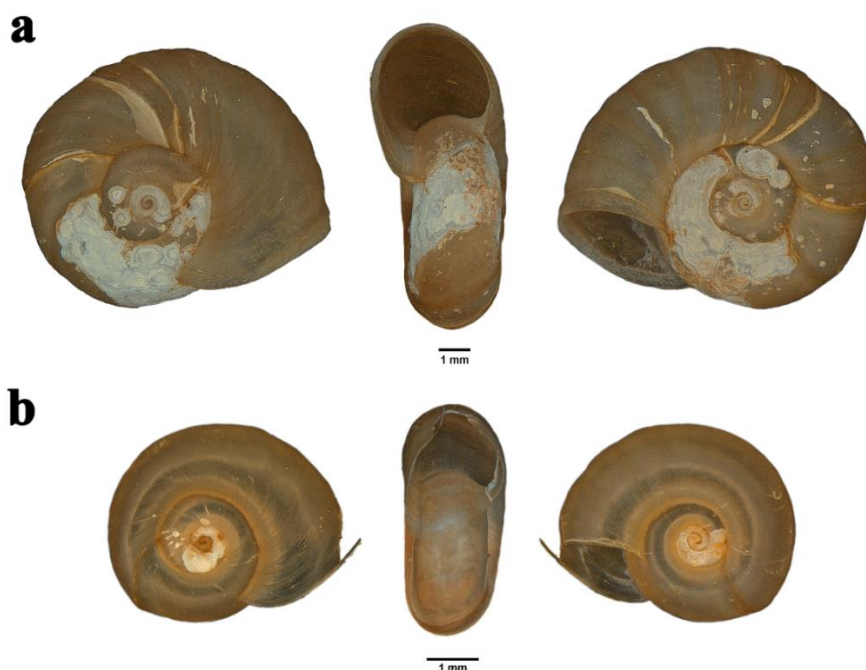


Figura 25. Conchas de *Biomphalaria straminea* de (a) Pelotas/RS (espécime 1) e (b) Sapucaia/PA (espécime 3).

3.2 Análise filogenética e divergência genética

O comprimento total das sequências concatenadas foi de 1315 pares de bases (COI = 1-655; ITS2 = 656-1315), incluindo dados ausentes para ambos os genes e gaps do ITS2. Os modelos de substituição de nucleotídeos foram HKY+I+G (I: 0,58, G: 2,329) para COI e GTR+G (G: 0,502) para ITS2. As árvores amostradas pelas cadeias de Markov após a eliminação do burn-in tiveram uma pontuação média de $\ln L = -6567,2382$. Os valores do Tamanho Efetivo da Amostra (ESS) foram todos acima de 776 amostras efetivamente independentes para todos os parâmetros, o que indica que a amostra foi robusta (LANFEAR; HUA; WARREN, 2016).

A análise filogenética dos genes concatenados recuperou um clado reunindo todas as sequências de *B. straminea* analisadas, subdividido em dois outros. Um deles reuniu os espécimes do estado do Pará (municípios de Parauapebas e Sapucaia), incluindo o espécime 8 de Sapucaia, com apenas três divertículos prostáticos. O outro clado incluiu os demais espécimes de *B. straminea* analisados, além das sequências de *B. kuhnia* obtidas do *GenBank*. A espécie *B. intermedia* foi recuperada na base deste clado, como um grupo irmão de *B. straminea*. Todos estes cladogramas foram fortemente suportados (BPP = 0,95–1,00; Figura 26).

O espécime 7 de Nossa Senhora de Lourdes/SE com a parede dorsal da vagina inchada ficou agrupado com *B. straminea* de outras localidades (Pelotas, Londrina, Parauapebas e Rio de Janeiro) na análise do gene mitocondrial (Anexo 7), nos quais observamos enrugamento vaginal típico. Além disso, o exemplar 8 de Sapucaia/PA, que apresentou três divertículos prostáticos, ficou agrupado com os demais espécimes desta localidade na análise do gene COI, enquanto na análise do gene ITS2, ficou num clado composto por espécimes de Nossa Senhora de Lourdes/SE e *B. kuhnia* (Anexo 8).

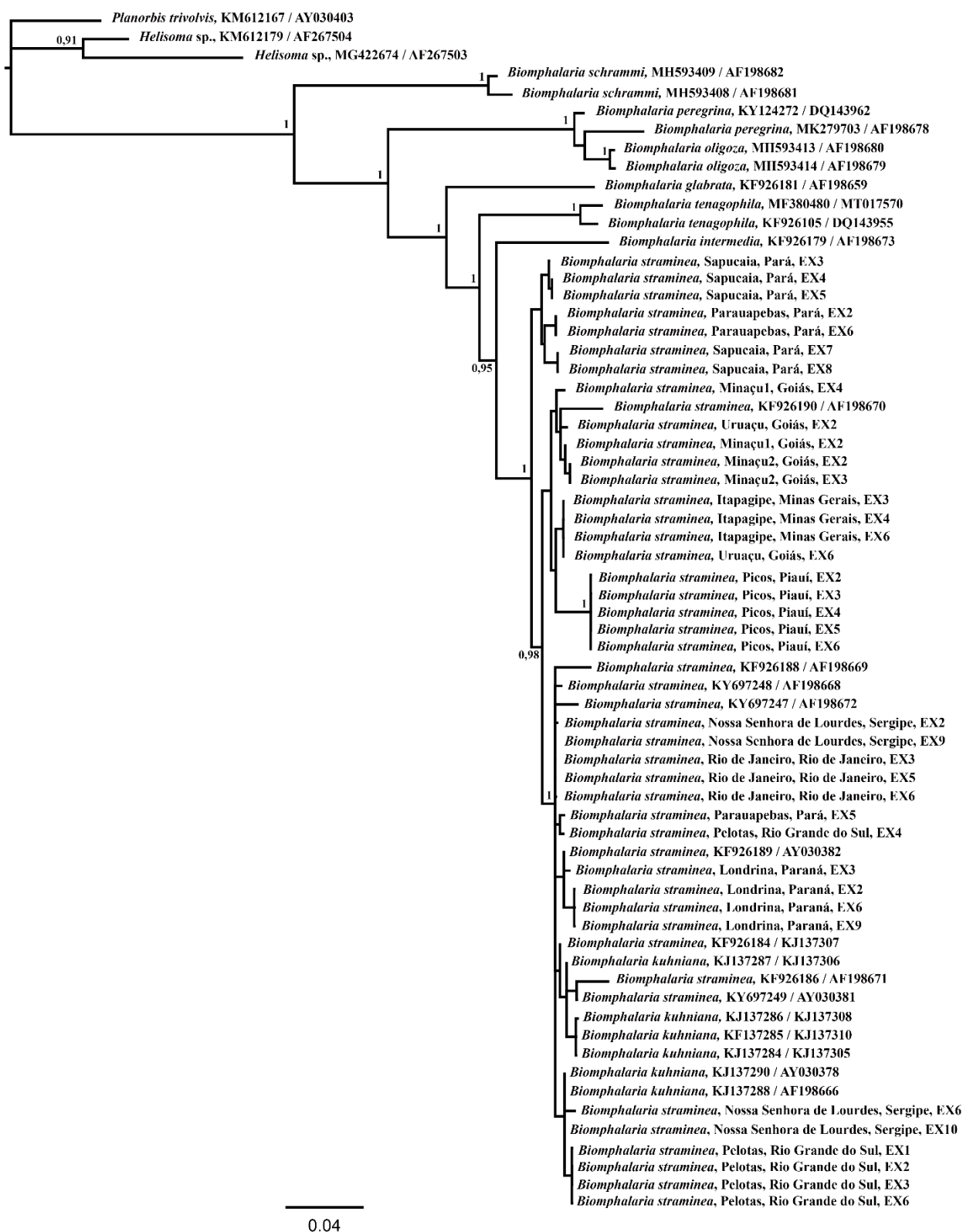


Figura 26. Árvore filogenética gerada pela análise dos genes concatenados (COI + ITS2) de *Biomphalaria straminea* e grupo externo incluídos no estudo por Inferência Bayesiana. Os valores de suporte dos ramos são probabilidades posteriores bayesianas (PPBs).

A análise baseada no gene COI demonstrou uma distância genética intraespecífica de 0–5% (Anexo 9). A maior divergência (5%) encontrada ocorreu entre os exemplares de Picos/PI e outras seis localidades (Rio de Janeiro, Pará, Nossa Senhora de Lourdes, Londrina, Pelotas e Sapucaia) e entre Picos/PI e *B. straminea* do Genbank. Foi observada sobreposição entre as distâncias intraespecíficas em *B. straminea* (0–5%) e interespecíficas entre *B. straminea* e *B. kuhniana* (0–4%). Os índices de divergência genética entre *B. straminea* e *B. intermedia* foi de 5 a 7%, enquanto entre *B. straminea* e as demais espécies de *Biomphalaria* foi de 7 (*B. tenagophila* e *B. occidentalis* e exemplares de Sapucaia) a 14% (*B. schrammi* e exemplares de Picos). A divergência genética entre os espécimes de *B. straminea* (*ingroup*) e *Helisoma* sp. (*outgroup*) foi de 14–18%.

A maior distância intraespecífica observada em *B. straminea* no gene ITS2 foi de 3% (Anexo 10), entre sequências de Uruaçu/GO, Londrina/PR e Sapucaia/PA e entre Uruaçu, Londrina e Pelotas/RS, e foi igual à distância máxima encontrada entre *B. kuhniana* e *B. straminea*. A divergência genética entre *B. straminea* e *B. intermedia* foi de 6–11%. Os índices de distância genética entre os espécimes de *B. straminea* e demais espécies de *Biomphalaria* variaram de 3% (*B. amazonica* e exemplares do Rio de Janeiro, Uruaçu, Itapagipe, Nossa Senhora de Lourdes e Londrina) a 21% (*B. peregrina* e exemplares de Picos e Sapucaia), enquanto a distância entre *B. straminea* e *Helisoma* sp. foi de 19–26%.

3.3 Rede de haplótipos

Para análise de distribuição dos haplótipos das sequências do gene COI, removemos os dados ausentes, e o comprimento final das sequências incluiu 585 sítios (número de sítios polimórficos (segregados), S: 428; número total de mutações, Eta: 462; número total de mutações únicas, Eta(s): 9). Dezesesseis haplótipos ($h = 16$) foram identificados com uma diversidade de haplótipos de (hd) = 0,9088, diversidade de nucleotídeos (π) = 0,0885 e número médio de diferenças de nucleotídeos (k) = 51,809. O número de haplótipos em cada localidade variou de um a três, com Picos/PI, Londrina/PR e Pelotas/RS não apresentando diversidade haplotípica, enquanto a maioria das localidades analisadas (Nossa Senhora de Lourdes/SE, Rio de Janeiro/RJ, Sapucaia /PA, Parauapebas/PA e Itapagipe/MG) e

duas do estado de Goiás (Uruaçu e Minaçu) apresentaram dois e três haplótipos, respectivamente (Fig. 27). Os espécimes de Parauapebas/PA, Rio de Janeiro/RJ e Pelotas/RS compartilharam um haplótipo com espécimes de Itariri/SP e Aparecida/SP. Este haplogrupo foi registrado no maior número de indivíduos e localidades. Espécimes do estado de São Paulo também compartilharam haplótipos com indivíduos do Rio de Janeiro/RJ, Londrina/PR, Parauapebas/PA e Sapucaia/PA. Os espécimes de Uruaçu e Minaçu compartilharam apenas um haplótipo, embora ambos os municípios sejam relativamente próximos no estado de Goiás. Em contrapartida, dois haplótipos dessas localidades foram compartilhados com espécimes de Itapagipe/MG.

A rede de haplótipos complementar (Fig. 28), na qual incluímos exemplares de *B. kuhniiana*, indicou o mesmo número de haplótipos e distribuição semelhante à da análise principal, ou seja, as sequências COI de *B. straminea* analisadas formaram basicamente os mesmos haplogrupos, com apenas algumas exceções. Quatro exemplares de Nossa Senhora de Lourdes/SE compartilharam um haplótipo com três espécimes de *B. kuhniiana* (H10), enquanto o outro exemplar (Nossa Senhora de Lourdes/SE 7) formou o haplótipo 11, que não foi compartilhado com nenhum outro, assim como as demais sequências de *B. kuhniiana*, que formaram o haplótipo 16. Além disso, o haplótipo 3, inicialmente compartilhado entre Londrina/PR e Ilhabela/SP, também foi compartilhado por dois exemplares de Santa Isabel/SP.

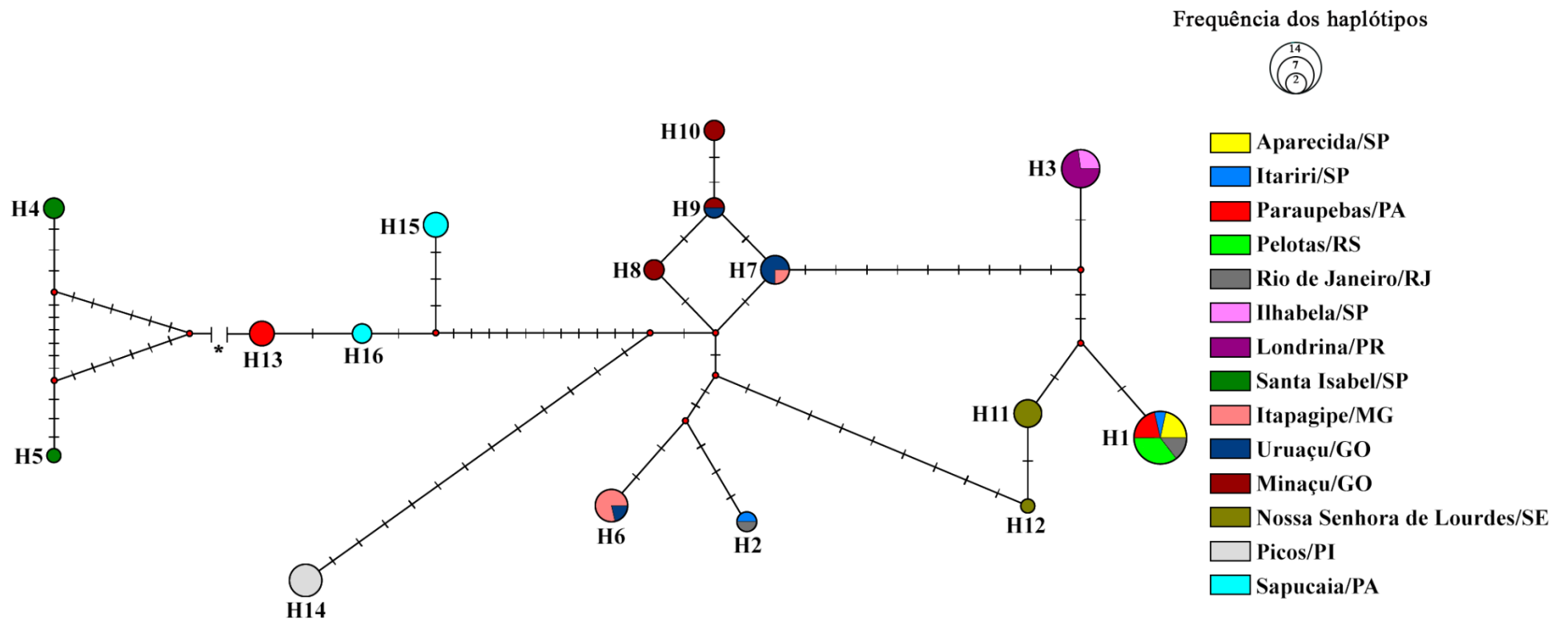


Figura 27. Rede de haplótipos das sequências do gene COI de *Biomphalaria straminea* analisadas e sequências de *Biomphalaria straminea* disponíveis no *Genbank*. Cada localidade é representada por uma cor diferente, conforme mostrado na legenda. Cada círculo representa um haplótipo e seu tamanho é proporcional ao número de indivíduos que compartilham esse haplótipo. Os losangos vermelhos representam haplótipos que não foram amostrados ou extintos. A lacuna marcada com um asterisco (*) representa um total de 405 mutações.

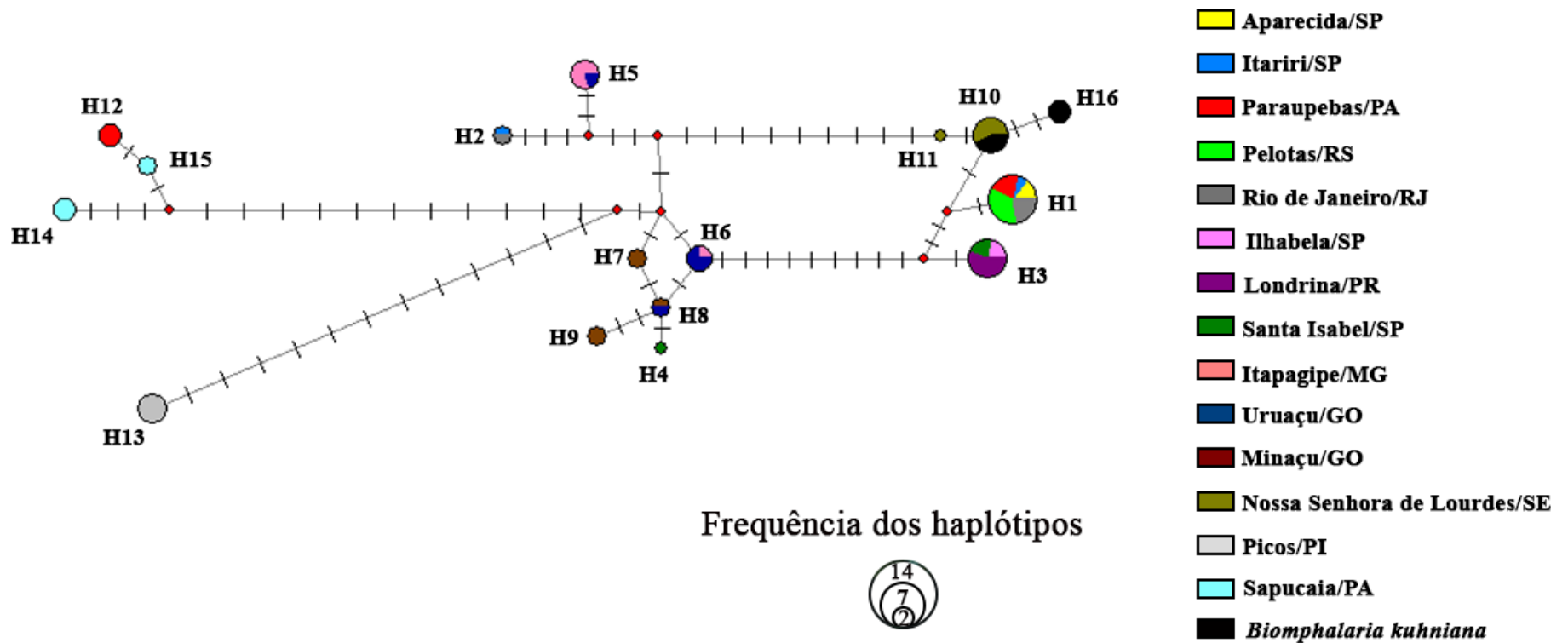


Figura 28. Rede de haplótipos das sequências do gene COI de *Biomphalaria straminea* analisadas e sequências de *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria kuhniana* disponíveis no *Genbank*. Cada localidade é representada por uma cor diferente, conforme mostrado na legenda. Cada círculo representa um haplótipo e seu tamanho é proporcional ao número de indivíduos que compartilham esse haplótipo. Os losangos vermelhos representam haplótipos que não foram amostrados ou extintos.

4. DISCUSSÃO

As espécies do complexo *B. straminea* podem ser identificadas erroneamente devido à plasticidade fenotípica que apresentam (PARAENSE, 1988; VIDIGAL et al., 2000b), o que além de causar confusão taxonômica tem importância epidemiológica na transmissão da esquistossomose. As análises integrativas do presente estudo confirmaram essa grande variabilidade dos caracteres morfológicos e moleculares de espécimes de *B. straminea* provenientes das cinco diferentes regiões do Brasil.

Nossos resultados corroboram estudos anteriores, como o de Paraense (1957), que destacou a presença de subpopulações de planorbídeos com características divergentes, mesmo dentro de uma mesma região geográfica. A variação encontrada na principal característica diagnóstica de *B. straminea* dificulta ainda mais a correta identificação da espécie. Nenhum enrugamento vaginal conspícuo – típico de *B. straminea* – foi observado em alguns indivíduos, enquanto em outros foi observado um inchaço nesta região. Portanto, há uma sobreposição potencial com as outras espécies do complexo *B. straminea*, podendo levar a identificações errôneas ou inconclusivas.

Alguns autores relataram menor variação nas características morfológicas em espécimes de *B. straminea*, como Palasio et al. (2017), que observaram que tanto *B. straminea* quanto *B. intermedia* apresentavam ondulações na parede dorsal da vagina, embora com variação considerável entre as espécies. Em *B. straminea* há ondulações enquanto em *B. intermedia* há um entumescimento (inchaço), o que de acordo com esses autores, faz com que essas espécies sejam muitas vezes identificadas erroneamente. Habib et al. (2018) analisaram espécimes de *B. straminea* introduzidos no sul da China, além de espécimes do Brasil e observaram que as principais características do sistema reprodutor eram consistentes com aquelas descritas na literatura.

No presente estudo verificamos que os indivíduos que apresentaram mais curvas no enrugamento vaginal também apresentaram a área do enrugamento com maior comprimento que os demais, apesar de isto não ter sido um padrão para todos os espécimes, isto é, nem sempre a menor área de enrugamento foi a que tinha menos curvas. Entretanto, ao observarmos as médias das localidades, podemos

notar que, de uma forma geral, quanto maior o comprimento da área de enrugamento vaginal, maior a quantidade de curvas na parede dorsal da vagina.

A variação observada no número de divertículos prostáticos através das análises quantitativas foi inferior (7–14) à encontrada por Paraense (1975) em indivíduos do estado de Minas Gerais, que apresentavam entre 5 e 20 divertículos, enquanto Palasio et al. (2017) citaram 20 divertículos e Habib et al. (2018), 10–20. Os índices de proporção foram consistentes com o relatado por Palasio et al. (2017), como a proporção entre a largura da base e do ápice do prepúcio, em que a extremidade livre do prepúcio foi invariavelmente mais larga, e aquela entre o comprimento da bainha do pênis e do prepúcio, com a bainha mais longa em todos os espécimes. Estes achados contrastam com os de Paraense (1975), em que o comprimento da bainha do pênis variou de um pouco mais curto a muito mais longo que o prepúcio. A variação observada na proporção entre a largura da bainha do pênis e do canal deferente (0,84–1,56) também foi menor do que a registrada por Paraense & Deslandes (1955), de $3,17 \pm 0,47$ mm.

As maiores médias das conchas observadas nos espécimes das nove localidades analisadas ($7,82$ mm \pm 1,08 de diâmetro e $3,23 \pm 0,34$ de altura) foram consideravelmente inferiores ao relatado por Paraense (1975), no qual as dimensões máximas foram de 16,5mm de diâmetro e 6mm altura. Além disso, os valores de diâmetros registrados no presente estudo ($7,82 \pm 1,08$ – $4,79 \pm 0,43$) foram mais semelhantes ao valor registrado para *B. kuhnia* (7,5 mm) do que para *B. straminea* (11,0–16,5 mm) por Paraense (1988). Contudo, embora algumas espécies de *Biomphalaria* tenham sido descritas pela primeira vez com base no diagnóstico de caracteres conquiliológicos, esses parâmetros não necessariamente fornecem critérios confiáveis para identificação, dada a sua vulnerabilidade à influência de uma série de variáveis, incluindo fatores ambientais e de crescimento (PARAENSE, 1961).

Em seu estudo sobre a sistemática dos planorbídeos brasileiros, Paraense (1975) enfatizou que os caracteres morfológicos usados para descrever cada espécie estão sujeitos a variações consideráveis. Um exemplo é a superfície lateral da concha, que pode ser mais ou menos côncava ou mesmo côncava de um lado e

convexa do outro. O autor conclui que “...essas características, que refletem a variação individual encontrada em algumas populações, podem se tornar características dominantes em outras populações, refletindo flutuações na frequência relativa dos genes que determinam essas características. Essa variação é responsável pelo grande número de sinônimos encontrados na literatura conchiliológica” (PARAENSE, 1975).

Nossos dados demonstram a monofilia de *B. straminea*, porém, ao incluirmos sequências de *B. kuhniana* obtidas do *GenBank*, estas foram recuperadas dentro do clado que reuniu as sequências de *B. straminea*, corroborando estudos anteriores (VIDIGAL et al., 2000b; DEJONG et al., 2001). Entre as hipóteses para explicar tal fato, está a possibilidade de identificação errônea de *B. kuhniana* ou de hibridização. Processos de hibridização já foram relatados em espécies de *Biomphalaria*, como entre *Biomphalaria cousini*, Paraense, 1966 e *Biomphalaria amazonica* (TEODORO et al., 2011) e poderiam produzir resultados inconsistentes entre os genes nuclear e mitocondrial, uma vez que o último é herdado da mãe ou do espécime que funciona como fêmea no momento da fecundação cruzada (DEJONG et al., 2001).

A maior divergência genética intraespecífica de *B. straminea* no gene COI (5%) foi a mesma que as distâncias interespecíficas encontradas entre alguns espécimes de *B. tenagophila* e *Biomphalaria occidentalis* e entre *B. intermedia* e *B. kuhniana*. É importante notar, entretanto, que esses pares de espécies são membros dos complexos *B. tenagophila* e *B. straminea*, respectivamente, enquanto a maior distância interespecífica entre *B. straminea* e *B. kuhniana* do *GenBank* foi menor (4%). Os maiores índices de distância intraespecífica foram observados entre os espécimes de Picos/PI e exemplares de seis localidades. Os cinco espécimes de Picos/PI ficaram agrupados no mesmo clado na análise filogenética do gene COI e dos genes concatenados, sem conter espécimes de outras localidades, indicando que não houve variabilidade genética nesses exemplares, o que pode ser atribuído ao fato de que esta colônia é uma das mais antigas dentre as que foram analisadas (mais de vinte anos no Moluscário).

No gene ribossomal, as maiores distâncias genéticas intraespecíficas observadas em *B. straminea* foram as mesmas que a maior distância interespecífica

entre *B. straminea* e *B. kuhniiana*, assim como entre *B. straminea* e *B. amazonica* (3%). Esses achados corroboram estudos anteriores que indicam que *B. amazonica* é provavelmente o parente mais próximo do complexo *B. straminea* (VIDIGAL et al., 2000b; DEJONG et al., 2001). Infelizmente, não foi possível utilizar sequências de *B. amazonica* na análise conjunta dos genes, devido à falta de sequências COI desta espécie no *Genbank*.

Estudos prévios mostraram índices de diversidade intraespecífica inferiores aos registrados neste estudo. Palasio et al. (2017) registraram uma diversidade genética de 3% para *B. straminea* de São Paulo e, embora a espécie *B. kuhniiana* não tenha sido analisada, não foi observada sobreposição entre as divergências intraespecíficas e interespecíficas. Em contraste, Palasio et al. (2019) analisaram 18 sequências do COI de *B. straminea* de São Paulo e registraram menor variação genética (0–1%), muito inferior à registrada em outros estudos. Mesmo assim, foi a maior variação intraespecífica registrada, além de *B. glabrata*.

A análise da distribuição dos haplótipos indicou fluxo gênico entre espécimes de *B. straminea* de diferentes bacias hidrográficas e outros corpos d'água, como observado em Uruaçu e Itapagipe (Fig. 29), Rio de Janeiro e Itariri (Fig. 30) e Londrina e Ilhabela (Fig. 31). Isso pode ocorrer devido à transferência passiva desses planorbídeos por meio de atividades humanas, transporte fluvial ou outros organismos. Sabe-se que a massa de ovos e mesmo os indivíduos adultos são altamente resistentes à dessecação, podendo ser transportados na plumagem de aves aquáticas (WOODRUFF; MULVEY, 1997; BILTON; FREELAND; OKAMURA, 2001; FIGUEROLA; GREEN, 2002), enquanto atividades humanas como a piscicultura ou a criação de habitats artificiais em terras agrícolas podem contribuir para a dispersão dos moluscos (MAVARÉZ et al., 2002, THIENGO; FERNANDEZ, 2008). Processos semelhantes podem ter contribuído para a estruturação do primeiro haplótipo, que foi compartilhado por sítios das regiões Norte, Sul e Sudeste do Brasil. No caso específico do haplótipo encontrado nas duas localidades do estado de Goiás, os reservatórios das hidrelétricas Cana Brava e Serra da Mesa estão localizados nos municípios de Minaçu e Uruaçu (Fig. 32), respectivamente, e esses corpos d'água são ligados fisicamente, o que implica o potencial de fluxo gênico entre os espécimes.

O haplótipo 10, resultante da análise de rede de haplótipos complementar, constituído por quatro espécimes de *B. straminea* provenientes de Nossa Senhora de Lourdes, SE, e três espécimes de *B. kuhniana*, corrobora os resultados da análise filogenética dos genes concatenados, na qual estes exemplares ficaram agrupados em um clado. Ainda que o exemplar 7 de Nossa Senhora de Lourdes tenha apresentado um inchaço no enrugamento vaginal, característica típica de *B. kuhniana*, este foi o único espécime desta localidade que não compartilhou haplótipo com esta espécie.

Embora Habib et al. (2018) tenham contestado a identificação das sequências COI depositadas por Attwood, Huo e Qiu (2015) para *B. kuhniana* (KJ137284–87), as quais atribuíram à *B. straminea*, os resultados da análise independente do gene ITS2 mostraram que outras sequências de *B. kuhniana* (AY030378-80; AF198666; AF19667) de diferentes estudos e países (VIDIGAL et al., 2000b; DEJONG et al., 2001) tiveram índice de divergência genética de 0% quando comparadas às sequências de *B. straminea* de nove das dez localidades estudadas, com exceção de Picos/PI, além de formarem um clado com algumas destas sequências.

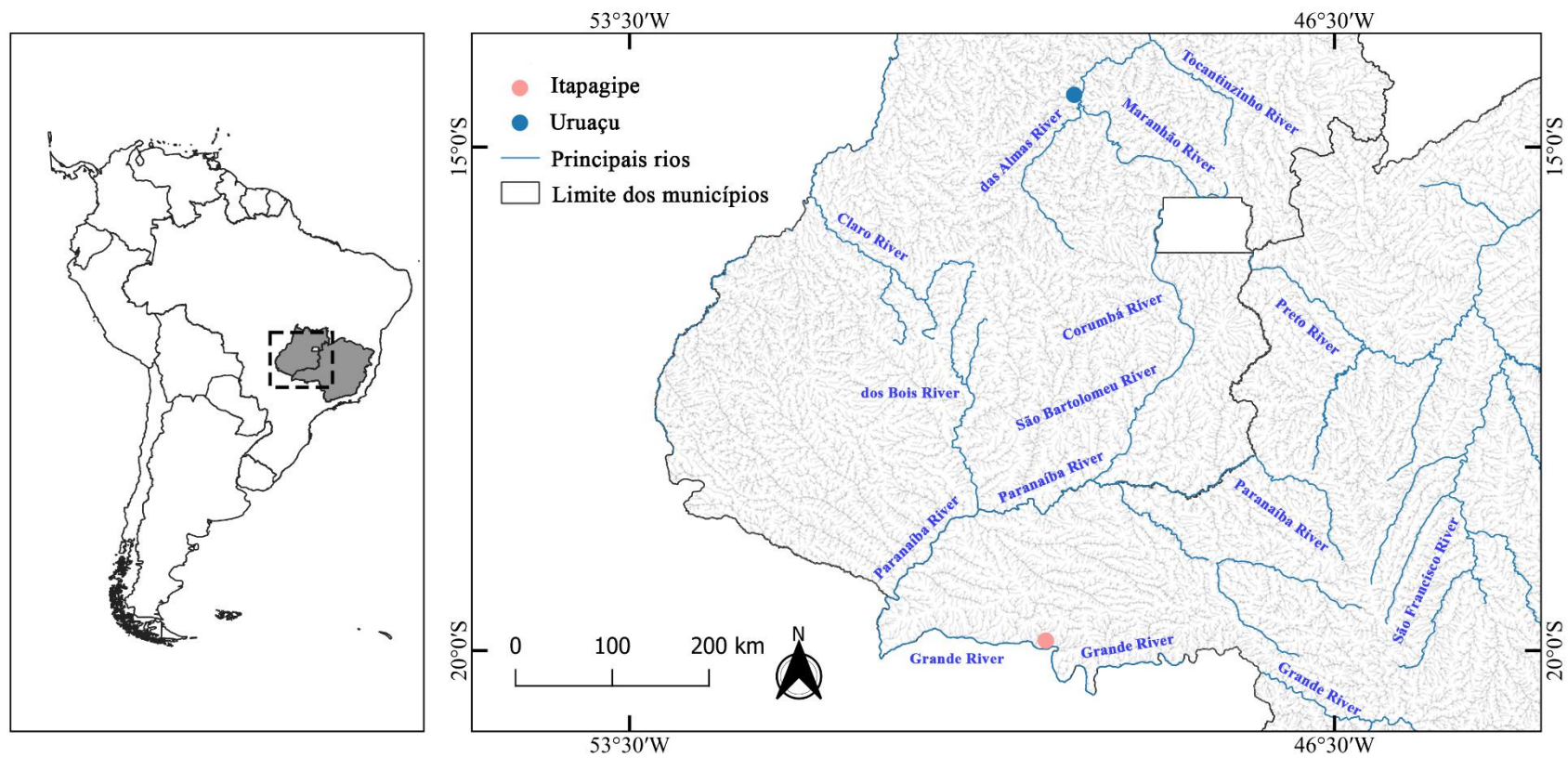


Figura 29. Localização dos municípios de Itapagipe e Uruaçu, e os principais rios dos estados de Minas Gerais e Goiás.

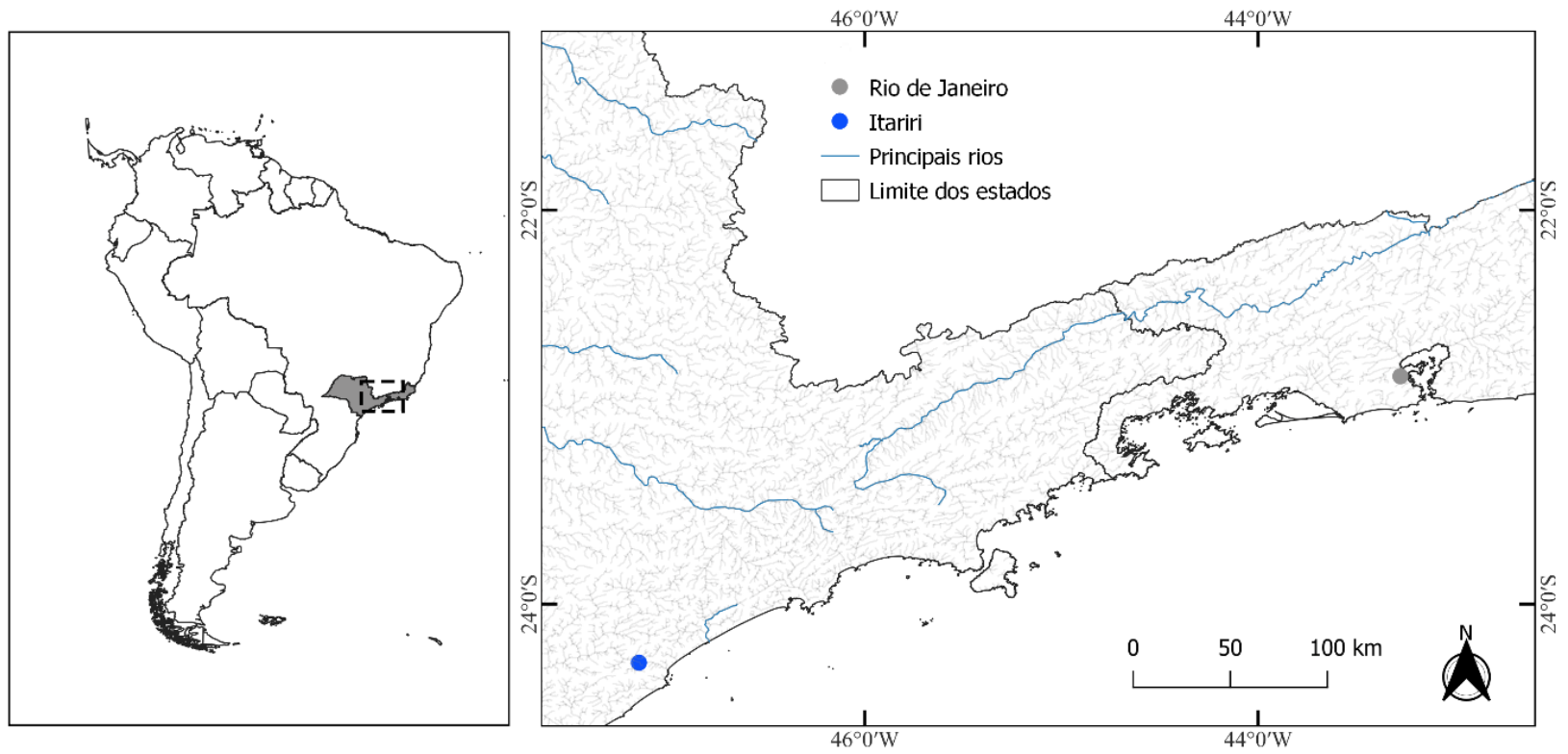


Figura 30. Localização da cidade do Rio de Janeiro e do município de Itariri, e os principais rios dos estados do Rio de Janeiro e São Paulo.

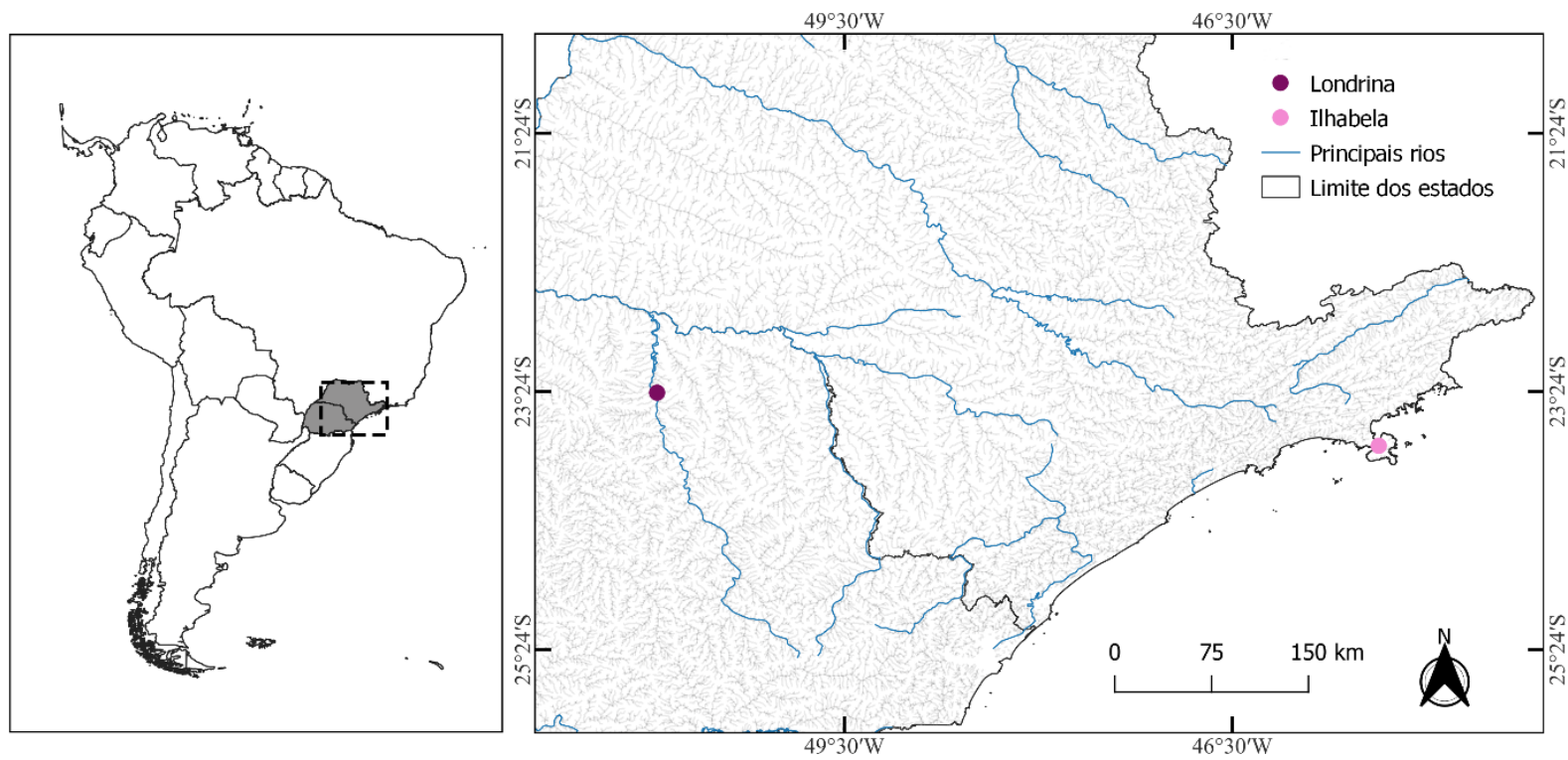


Figura 31. Localização dos municípios de Londrina e Ilhabela e os principais rios dos estados do Paraná e São Paulo.

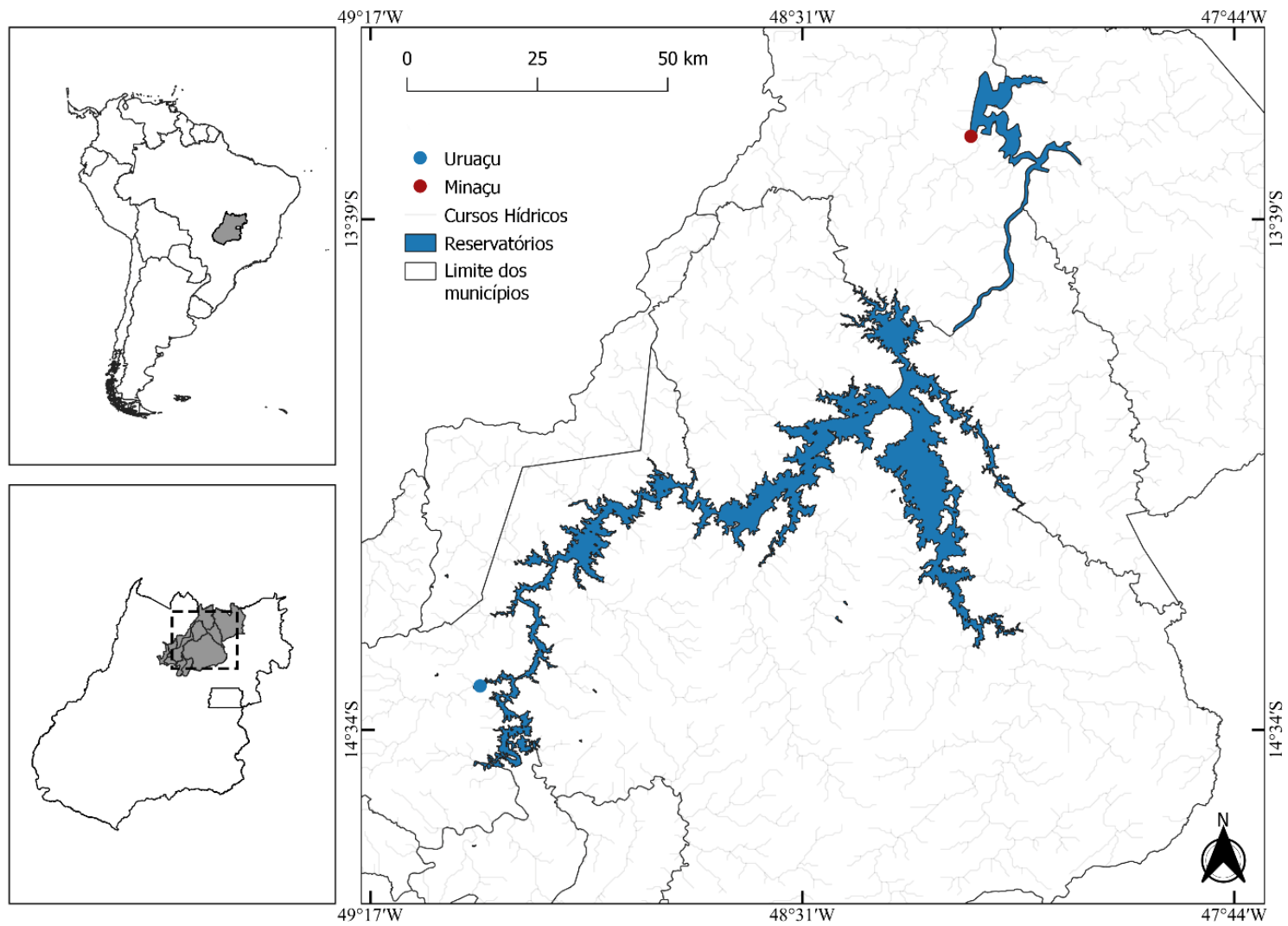


Figura 32. Localização dos municípios de Minaçu e Uruaçu, estado de Goiás, e seus reservatórios.

Nossos resultados demonstraram a presença de um maior número de haplótipos ($h = 16$), diversidade haplotípica ($hd = 0,9088$), diversidade de nucleotídeos ($\pi = 0,0885$) e número médio de diferenças de nucleotídeos ($k = 51,809$) do que os mencionados em estudos anteriores. Palasio et al. (2017), por exemplo, utilizaram *DNA barcode* para identificar as espécies de *Biomphalaria* e analisaram espécimes de *B. straminea* de São Paulo, além de um espécime de *B. intermedia*. Esses autores encontraram seis haplótipos, e a diversidade de haplótipos e nucleotídeos para *B. straminea*, enquanto o número médio de diferenças nos nucleotídeos registrados nos onze espécimes de *B. straminea* foi $hd = 0,836$; $\pi = 0,01199$; $k = 6,582$, respectivamente. Habib et al. (2018) também registraram baixos níveis de diversidade de haplótipos com base nos marcadores COI e 16S, com quatro e três haplótipos distintos, respectivamente, em espécimes do Brasil e da China, com diversidade de nucleotídeos (π) de 0,004488 e 0,005587 para ambos os genes. A alta diversidade de haplótipos observada em *B. straminea* pode ser devido ao número de sequências analisadas neste estudo, além de serem provenientes das cinco regiões do Brasil, reforçando a importância de analisar diversos espécimes de regiões distintas (ou de toda a distribuição geográfica da espécie), conforme recomendado por Paraense (1957).

Nossos resultados são consistentes com os achados de Palasio et al. (2019), que mostram que a divergência genética e as semelhanças nos caracteres morfológicos das espécies de *Biomphalaria* indicam que esses caracteres fenotípicos, usados tradicionalmente para delimitar as espécies, não são adequados para a descrição abrangente da diversidade do grupo, ressaltando a importância de estudos integrativos em taxonomia, em especial para a correta identificação de espécies crípticas, como as do complexo *B. straminea*. Esta abordagem fornece ferramentas essenciais para a compreensão das relações evolutivas intra e interespecíficas dos planorbídeos, bem como para a delimitação de espécies.

Os dados do presente estudo demonstram a necessidade de se investigar mais espécimes de *B. kuhniana* e de outras espécies brasileiras com semelhanças morfológicas com *B. straminea*, visando avaliar a validade das espécies reconhecidas atualmente no complexo *B. straminea* e auxiliar na clarificação taxonômica desse importante grupo de planorbídeos.

5. CONCLUSÃO

Os dados do presente estudo representam uma importante contribuição ao entendimento da variação morfológica e molecular de populações de *B. straminea* que ocorrem no Brasil, além de ampliar o banco de dados genético desta espécie, o que permitirá futuras análises taxonômicas comparativas com as demais espécies do Complexo *B. straminea*.

A grande variabilidade morfológica e molecular observada em *B. straminea* e suas semelhanças com outras espécies congênicas, demonstram a necessidade de estudos mais extensivos do chamado Complexo *B. straminea*, incluindo exemplares provenientes da localidade tipo destas espécies.

A pouca disponibilidade de sequências no *Genbank*, sobretudo de *B. kuhniiana*, *B. intermedia* e *B. amazonica* também dificulta uma compreensão mais ampla da história evolutiva deste grupo. Sendo assim, estudos com uma maior amostragem são essenciais para entender as relações entre essas espécies. Além disso, estudos laboratoriais de cruzamento podem ajudar a elucidar possíveis processos de hibridização.

6. ANEXOS

6.1 Anexo 1. Táxons da família Planorbidae utilizados nas análises filogenéticas e os respectivos códigos do *Genbank* para acesso às sequências.

Táxons	Número de acesso ao <i>GenBank</i>	
	COI	ITS2
<i>Planorbis trivolvis</i>	KM612167	AY030403
<i>Planorbis trivolvis</i>	KM612028	--
<i>Helisoma</i> sp	KM612179	--
<i>Helisoma</i> sp	MG422674	--
<i>Helisoma duryi</i>	--	AF267503
<i>Helisoma duryi</i>	--	AF267504
<i>Biomphalaria peregrina</i>	KY124272	DQ143962
<i>Biomphalaria peregrina</i>	MK279703	AF198678
<i>Biomphalaria tenagophila</i>	MF380480	MT017570
<i>Biomphalaria tenagophila</i>	KF926105	DQ143955
<i>Biomphalaria schrammi</i>	MH593409	AF198682
<i>Biomphalaria schrammi</i>	MH593408	AF198681
<i>Biomphalaria oligoza</i>	MH593413	AF198680
<i>Biomphalaria oligoza</i>	MH593414	AF198679
<i>Biomphalaria occidentalis</i>	MH593419	--
<i>Biomphalaria occidentalis</i>	KF926175	--
<i>Biomphalaria amazonica</i>	--	AF198665
<i>Biomphalaria amazonica</i>	--	KP217167
<i>Biomphalaria glabrata</i>	--	DQ143953
<i>Biomphalaria glabrata</i>	KF926181	AF198659
<i>Biomphalaria intermedia</i>	KF926179	AF198673
<i>Biomphalaria intermedia</i>	--	AF198674
<i>Biomphalaria intermedia</i>	--	AF198675
<i>Biomphalaria intermedia</i>	--	AY030383
<i>Biomphalaria kuhniana</i>	KJ137286	KJ137305
<i>Biomphalaria kuhniana</i>	KJ137285	KJ137306
<i>Biomphalaria kuhniana</i>	KJ137284	KJ137308
<i>Biomphalaria kuhniana</i>	KJ137287	KJ137309
<i>Biomphalaria kuhniana</i>	KJ137290	KJ137310
<i>Biomphalaria kuhniana</i>	KJ137288	KJ137311
<i>Biomphalaria kuhniana</i>	--	AY030378
<i>Biomphalaria kuhniana</i>	--	AY030379

<i>Biomphalaria kuhniana</i>	--	AY030380
<i>Biomphalaria kuhniana</i>	--	AF198666
<i>Biomphalaria kuhniana</i>	--	AF198667
<i>Biomphalaria straminea</i>	KF926184	AF198668
<i>Biomphalaria straminea</i>	KF926185	AF198669
<i>Biomphalaria straminea</i>	KF926186	AF198670
<i>Biomphalaria straminea</i>	KF926187	AF198671
<i>Biomphalaria straminea</i>	KF926188	AF198672
<i>Biomphalaria straminea</i>	KF926189	AY030381
<i>Biomphalaria straminea</i>	KF926190	AY030382
<i>Biomphalaria straminea</i>	KF926191	KJ137307
<i>Biomphalaria straminea</i>	KF926195	--
<i>Biomphalaria straminea</i>	KY697246	--
<i>Biomphalaria straminea</i>	KY697247	--
<i>Biomphalaria straminea</i>	KY697248	--
<i>Biomphalaria straminea</i>	KY697249	--

6.2 Anexo 2. Localidades dos espécimes de *Biomphalaria straminea* sequenciados no presente estudo e seus respectivos códigos (provisórios) do *Genbank*.

Espécimes	Número de acesso ao <i>GenBank</i>	
	COI	ITS2
Itapagipe, Minas Gerais EX1	ON714050	--
Itapagipe, Minas Gerais EX2	ON714049	--
Itapagipe, Minas Gerais EX3	ON704917	ON707165
Itapagipe, Minas Gerais EX4	ON704918	ON707166
Itapagipe, Minas Gerais EX6	ON704919	ON707167
Londrina, Paraná EX2	ON704920	ON707168
Londrina, Paraná EX3	ON704921	ON707169
Londrina, Paraná EX5	ON714054	--
Londrina, Paraná EX6	ON704922	ON707170
Londrina, Paraná EX9	ON704923	ON707171
Minaçu1, Goiás EX1	ON714059	--
Minaçu1, Goiás EX2	ON704924	ON707172
Minaçu1, Goiás EX4	ON704925	ON707173
Minaçu2, Goiás EX2	ON704926	ON707174
Minaçu2, Goiás EX3	ON704927	ON707175
Nossa Sra. de Lourdes, Sergipe EX2	ON704928	ON707176
Nossa Sra. de Lourdes, Sergipe EX6	ON704929	ON707177
Nossa Sra. de Lourdes, Sergipe EX7	ON714055	--
Nossa Sra. de Lourdes, Sergipe EX9	ON704930	ON707178
Nossa Sra. de Lourdes, Sergipe EX10	ON704931	ON707179
Parauapebas, Pará EX2	ON704932	ON707180
Parauapebas, Pará EX3	--	OP618545
Parauapebas, Pará EX4	ON714058	--
Parauapebas, Pará EX5	ON704933	ON707181
Parauapebas, Pará EX6	ON704934	ON707182
Parauapebas, Pará EX7	ON714056	--
Parauapebas, Pará EX12	ON714057	--
Pelotas, Rio Grande do Sul EX1	ON704935	ON707183
Pelotas, Rio Grande do Sul EX2	ON704936	ON707184
Pelotas, Rio Grande do Sul EX3	ON704937	ON707185
Pelotas, Rio Grande do Sul EX4	ON704938	ON707186
Pelotas, Rio Grande do Sul EX6	ON704939	ON707187
Picos, Piauí EX2	ON704940	ON707188
Picos, Piauí EX3	ON704941	ON707189

Picos, Piauí EX4	ON704942	ON707190
Picos, Piauí EX5	ON704943	ON707191
Picos, Piauí EX6	ON704944	ON707192
Rio de Janeiro, Rio de Janeiro EX2	ON714060	--
Rio de Janeiro, Rio de Janeiro EX3	ON704945	ON707193
Rio de Janeiro, Rio de Janeiro EX5	ON704946	ON707194
Rio de Janeiro, Rio de Janeiro EX6	ON704947	ON707195
Sapucaia, Pará EX3	ON704948	ON707196
Sapucaia, Pará EX4	ON704949	ON707197
Sapucaia, Pará EX5	ON704950	ON707198
Sapucaia, Pará EX7	ON704951	ON707199
Sapucaia, Pará EX8	ON704952	ON707200
Uruaçu, Goiás EX1	ON714053	--
Uruaçu, Goiás EX2	ON704953	ON707201
Uruaçu, Goiás EX3	ON714052	--
Uruaçu, Goiás EX5	ON714051	--
Uruaçu, Goiás EX6	ON704954	ON707202

6.3 Anexo 3. Códigos de acesso às sequências de *Biomphalaria straminea* do *GenBank* e suas respectivas localidades no estado de São Paulo (Palasio *et al.*, 2017) utilizadas na análise de distribuição haplotípica (COI).

Número de acesso ao <i>GenBank</i>	Localidade
KF926188	Itariri/SP
KF926185	Itariri/SP
KF926186	Aparecida/SP
KF926184	Aparecida/SP
KF926195	Santa Isabel/SP
KF926189	Santa Isabel/SP
KF926190	Santa Isabel/SP
KF926191	Ilha Bela/SP
KF926187	Ilha Bela/SP

6.4 Anexo 4. Parâmetros morfológicos dos sistemas reprodutores masculino e feminino nos espécimes de *Biomphalaria straminea* obtidos nos municípios e estados representativos das diferentes regiões do Brasil.

Média ± desvio padrão (em mm) registrado na localidade de:

Caracteres*	Pelotas (RS)	Sapucaia (PA)	Londrina (PA)	Minaçu (GO)	Uruaçu (GO)	Itapagipe (MG)	Picos (PI)	Rio de Janeiro (RJ)	Parauapebas (PA)
1	2,39 ± 0,51	1,58 ± 0,19	2,48 ± 0,32	1,89 ± 0,37	1,90 ± 0,57	2,05 ± 0,38	2,40 ± 0,50	2,45 ± 0,41	2,44 ± 0,26
2	0,38 ± 0,19	0,28 ± 0,11	0,35 ± 0,05	0,31 ± 0,05	0,35 ± 0,08	0,41 ± 0,05	0,32 ± 0,05	0,34 ± 0,07	0,29 ± 0,07
3	0,69 ± 0,34	0,40 ± 0,11	0,57 ± 0,14	0,46 ± 0,19	0,50 ± 0,13	0,53 ± 0,21	0,66 ± 0,16	0,52 ± 0,06	0,76 ± 0,51
4	3,52 ± 1,00	2,15 ± 0,44	3,40 ± 0,39	2,93 ± 0,44	2,70 ± 0,49	2,70 ± 0,46	3,16 ± 0,55	3,22 ± 0,42	3,33 ± 0,44
5	0,19 ± 0,07	0,16 ± 0,03	0,17 ± 0,04	0,14 ± 0,02	0,19 ± 0,05	0,22 ± 0,04	0,23 ± 0,06	0,20 ± 0,06	0,16 ± 0,03
6	0,21 ± 0,11	0,10 ± 0,02	0,17 ± 0,02	0,13 ± 0,03	0,17 ± 0,03	0,18 ± 0,03	0,16 ± 0,03	0,17 ± 0,05	0,19 ± 0,04
7	11 ± 0	9 ± 1	11 ± 2	8 ± 1	10 ± 3	9 ± 2	12 ± 1	12 ± 1	12 ± 1
8	0,44 ± 0,09	0,35 ± 0,06	0,41 ± 0,11	0,33 ± 0,10	0,43 ± 0,08	0,61 ± 0,15	0,37 ± 0,10	0,36 ± 0,10	0,47 ± 0,13
9	5 ± 2	4 ± 3	5 ± 1	6 ± 4	6 ± 4	10 ± 4	5 ± 2	5 ± 2	6 ± 3
10	2,14 ± 0,26	0,93 ± 0,15	2,03 ± 0,49	0,87 ± 0,32	1,34 ± 0,47	1,19 ± 0,82	1,07 ± 0,20	1,35 ± 0,20	1,51 ± 0,30
11	0,83 ± 0,12	0,40 ± 0,11	0,67 ± 0,17	0,53 ± 0,13	0,52 ± 0,18	0,50 ± 0,34	0,78 ± 0,20	0,70 ± 0,16	0,52 ± 0,11
12	0,85 ± 0,15	0,65 ± 0,07	1,06 ± 0,06	0,64 ± 0,06	0,75 ± 0,22	0,76 ± 0,13	0,98 ± 0,18	0,95 ± 0,24	0,71 ± 0,15
13	1,25 ± 0,36	0,72 ± 0,12	1,24 ± 0,17	0,69 ± 0,15	0,86 ± 0,19	1,40 ± 0,39	1,08 ± 0,24	0,93 ± 0,25	1,01 ± 0,13
14	0,42 ± 0,18	0,36 ± 0,15	0,54 ± 0,04	0,41 ± 0,11	0,39 ± 0,06	0,61 ± 0,13	0,59 ± 0,26	0,44 ± 0,12	0,42 ± 0,20
15	0,69 ± 0,39	0,76 ± 0,19	0,86 ± 0,18	0,72 ± 0,22	1,07 ± 0,17	0,97 ± 0,33	0,87 ± 0,13	0,76 ± 0,19	0,76 ± 0,21
16	3 ± 2	4 ± 3	4 ± 0	4 ± 1	6 ± 2	5 ± 2	2 ± 1	3 ± 2	5 ± 2

***Caracteres:** **1:** comprimento do prepúcio; **2:** largura do ápice do prepúcio; **3:** largura da base do prepúcio; **4:** comprimento da bainha do pênis; **5:** largura da bainha do pênis; **6:** largura máxima do canal deferente; **7:** número de divertículos prostáticos; **8:** comprimento do divertículo basal; **9:** número de ramos do divertículo basal; **10:** comprimento entre o primeiro e último divertículo; **11:** comprimento entre a abertura feminina e a inserção da espermateca; **12:** comprimento do canal da espermateca; **13:** comprimento da espermateca; **14:** largura da espermateca; **15:** comprimento da área do enrugamento vaginal; **16:** número de curvas do enrugamento vaginal.

6.5 Anexo 5. Médias das proporções entre os parâmetros morfológicos registrados em cada localidade de *Biomphalaria straminea* (município).

Média registrada na localidade de:									
Proporção*	Pelotas	Sapucaia	Londrina	Minaçu	Uruaçu	Itapagipe	Picos	Rio de Janeiro	Parauapebas
1	1,48	1,37	1,37	1,55	1,42	1,32	1,32	1,31	1,36
2	1,84	1,42	1,65	1,48	1,41	1,28	2,06	1,53	2,62
3	0,19	0,11	0,19	0,11	0,14	0,13	0,09	0,12	0,13
4	3	2,01	2,28	1,68	2,23	2,29	1,83	2,11	2,4
5	1,48	1,11	1,17	1,08	1,15	1,84	1,1	0,98	1,42
6	0,23	0,19	0,23	0,18	0,17	0,19	0,44	0,25	0,15
7	0,32	0,81	0,42	0,83	0,8	0,81	0,81	0,56	0,5
8	0,9	1,56	1,02	1,08	1,14	1,17	1,44	1,18	0,84

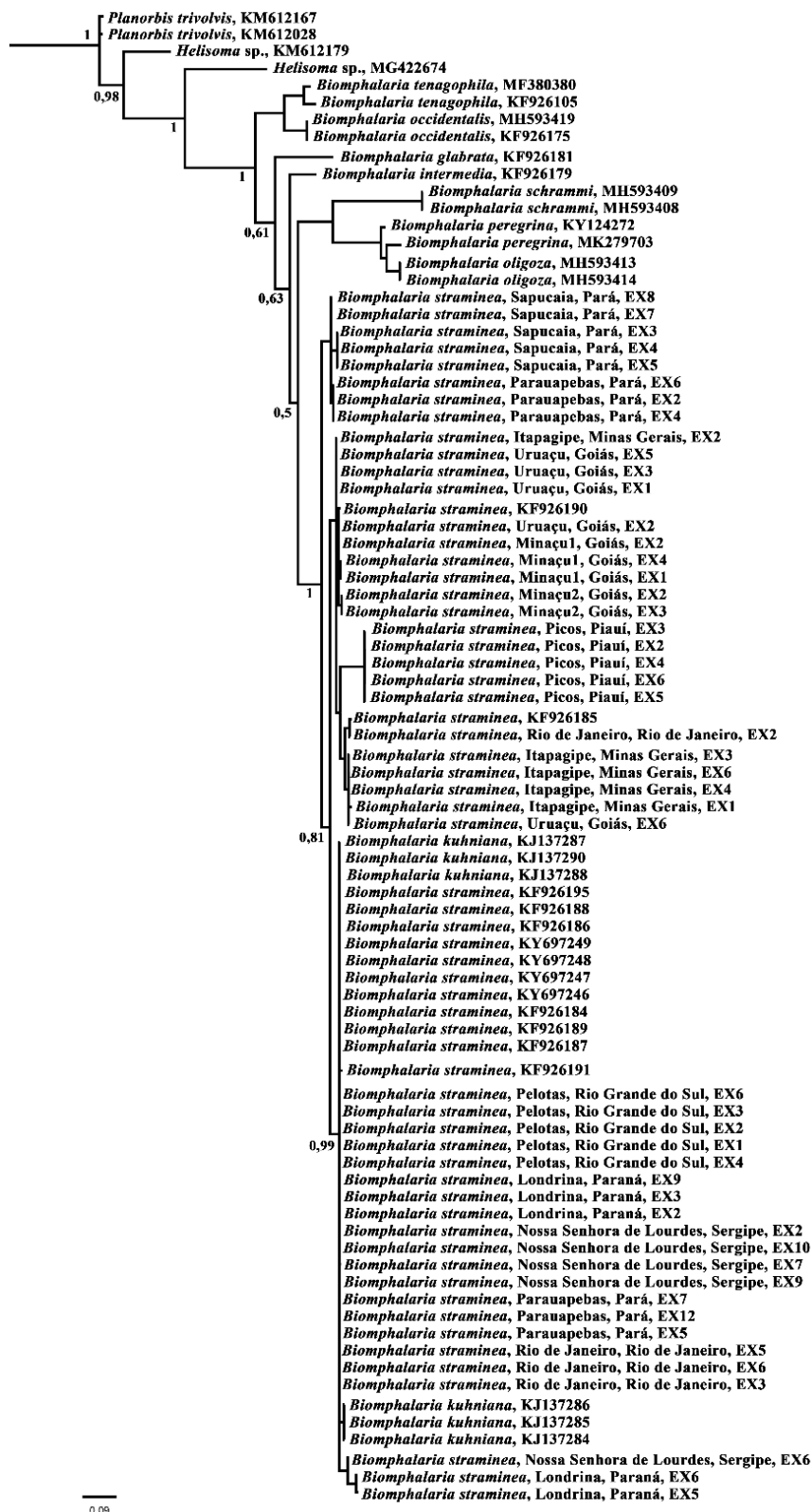
***Proporções entre os parâmetros morfológicos:** 1: comprimento da bainha do pênis e do prepúcio; 2: largura da base e do ápice do prepúcio; 3: comprimento da área dos divertículos e quantidade de divertículos prostáticos; 4: comprimento e largura da espermateca; 5: comprimento da espermateca e do canal da espermateca; 6: comprimento do enrugamento vaginal e quantidade de curvas; 7: comprimento do enrugamento vaginal e da área dos divertículos prostáticos ; 8: largura máxima do canal deferente e da bainha peniana.

6.6 Anexo 6. Média e desvio padrão das medidas de diâmetro e altura das conchas de *Biomphalaria straminea* dos diferentes locais (municípios) analisados.

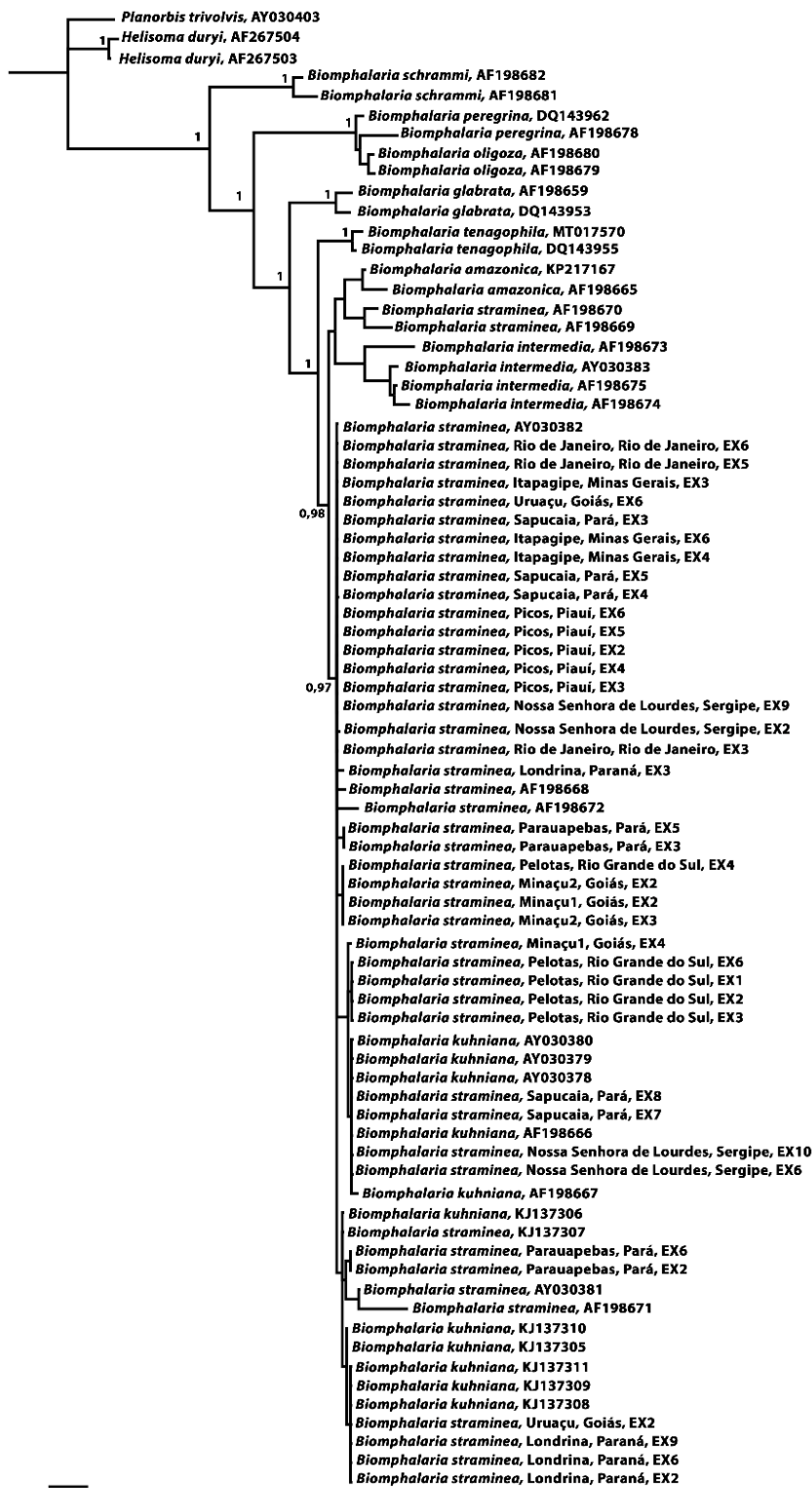
Média ± desvio padrão (em mm) registrado na localidade de:

Caracter	Pelotas	Sapucaia	Londrina	Minaçu	Uruaçu	Itapagipe	Picos	Rio de Janeiro	Parauapebas
Diâmetro	7,82 ± 1,08	4,79 ± 0,43	7,60 ± 0,70	5,72 ± 1,13	6,15 ± 0,91	6,96 ± 0,37	7,61 ± 0,61	6,39 ± 0,53	6,19 ± 0,89
Altura	3,23 ± 0,34	2,11 ± 0,20	2,77 ± 0,16	2,47 ± 0,30	2,54 ± 0,32	2,93 ± 0,06	2,81 ± 0,21	2,25 ± 0,17	2,37 ± 0,26

6.7 Anexo 7. Árvore filogenética gerada pela análise do gene COI de *Biomphalaria straminea* e grupo externo incluídos no estudo por Inferência Bayesiana. Os valores de suporte dos ramos são probabilidades posteriores bayesianas (PPBs)



6.8 Anexo 8. Árvore filogenética gerada pela análise do gene ITS2 de *Biomphalaria straminea* e grupo externo incluídos no estudo por Inferência Bayesiana. Os valores de suporte dos ramos são probabilidades posteriores bayesianas (PPBs).



0.07

6.9 Anexo 9. Distâncias genéticas intra e interespecíficas do gene COI recuperadas através do modelo Kimura 2 Parâmetros (Kimura, 1980) no software MEGAX (Kumar et al., 2018).

Táxon 1	Táxon 2	Distância mínima	Distância máxima
Intraespecífica			
<i>Planorbis trivolvis</i>		0.01	0.01
<i>Helisoma</i> sp.		0.16	0.16
<i>Biomphalaria peregrina</i>		0.03	0.03
<i>Biomphalaria tenagophila</i>		0.02	0.02
<i>Biomphalaria schrammi</i>		0.00	0.00
<i>Biomphalaria oligoza</i>		0.00	0.00
<i>Biomphalaria occidentalis</i>		0.00	0.00
<i>Biomphalaria glabrata</i>		--	--
<i>Biomphalaria intermedia</i>		--	--
<i>Biomphalaria kuhniana</i>		0.00	0.00
<i>Biomphalaria straminea</i>		0.00	0.05
Interespecífica			
<i>Planorbis trivolvis</i>	<i>Helisoma</i> sp.	0.08	0.16
	<i>B. peregrina</i>	0.15	0.16
	<i>B. tenagophila</i>	0.13	0.14
	<i>B. schrammi</i>	0.14	0.14
	<i>B. oligoza</i>	0.15	0.16
	<i>B. occidentalis</i>	0.14	0.15
	<i>B. glabrata</i>	0.16	0.16
	<i>B. intermedia</i>	0.13	0.13
	<i>B. kuhniana</i>	0.15	0.15
	<i>B. straminea</i>	0.14	0.16
<i>Helisoma</i> sp.	<i>B. peregrina</i>	0.17	0.19
	<i>B. tenagophila</i>	0.14	0.16
	<i>B. schrammi</i>	0.15	0.17
	<i>B. oligoza</i>	0.18	0.18
	<i>B. occidentalis</i>	0.15	0.15
	<i>B. glabrata</i>	0.15	0.16
	<i>B. intermedia</i>	0.15	0.16
	<i>B. kuhniana</i>	0.17	0.18
	<i>B. straminea</i>	0.14	0.18
<i>Biomphalaria peregrina</i>	<i>B. tenagophila</i>	0.11	0.13
	<i>B. schrammi</i>	0.11	0.14

	<i>B. oligoza</i>	0.02	0.03
	<i>B. occidentalis</i>	0.10	0.12
	<i>B. glabrata</i>	0.11	0.13
	<i>B. intermedia</i>	0.09	0.10
	<i>B. kuhniiana</i>	0.09	0.11
	<i>B. straminea</i>	0.08	0.12
<i>Biomphalaria tenagophila</i>	<i>B. schrammi</i>	0.12	0.13
	<i>B. oligoza</i>	0.11	0.11
	<i>B. occidentalis</i>	0.05	0.06
	<i>B. glabrata</i>	0.09	0.09
	<i>B. intermedia</i>	0.08	0.09
	<i>B. kuhniiana</i>	0.09	0.10
	<i>B. straminea</i>	0.07	0.11
<i>Biomphalaria schrammi</i>	<i>B. oligoza</i>	0.12	0.12
	<i>B. occidentalis</i>	0.12	0.12
	<i>B. glabrata</i>	0.13	0.13
	<i>B. intermedia</i>	0.12	0.12
	<i>B. kuhniiana</i>	0.13	0.13
	<i>B. straminea</i>	0.12	0.14
<i>Biomphalaria oligoza</i>	<i>B. occidentalis</i>	0.10	0.10
	<i>B. glabrata</i>	0.11	0.11
	<i>B. intermedia</i>	0.09	0.10
	<i>B. kuhniiana</i>	0.10	0.10
	<i>B. straminea</i>	0.09	0.11
<i>Biomphalaria occidentalis</i>	<i>B. glabrata</i>	0.09	0.09
	<i>B. intermedia</i>	0.08	0.08
	<i>B. kuhniiana</i>	0.09	0.09
	<i>B. straminea</i>	0.07	0.10
<i>Biomphalaria glabrata</i>	<i>B. intermedia</i>	0.08	0.08
	<i>B. kuhniiana</i>	0.09	0.10
	<i>B. straminea</i>	0.08	0.10
<i>Biomphalaria intermedia</i>	<i>B. kuhniiana</i>	0.06	0.06
	<i>B. straminea</i>	0.05	0.07
<i>Biomphalaria kuhniiana</i>	<i>B. straminea</i>	0.00	0.04

6.10 Anexo 10. Distâncias genéticas intra e interespecíficas do gene ITS2 recuperadas através do modelo Kimura 2 Parâmetros (Kimura, 1980) no software MEGAX (Kumar et al., 2018).

Táxon 1	Táxon 2	Distância mínima	Distância máxima
Intraespecífica			
<i>Planorbis trivolvis</i>		--	--
<i>Helisoma duryi</i>		0.01	0.01
<i>Biomphalaria peregrina</i>		0.05	0.05
<i>Biomphalaria tenagophila</i>		0.01	0.01
<i>Biomphalaria schrammi</i>		0.04	0.04
<i>Biomphalaria oligoza</i>		0.01	0.01
<i>Biomphalaria amazonica</i>		0.03	0.03
<i>Biomphalaria glabrata</i>		0.03	0.03
<i>Biomphalaria intermedia</i>		0.01	0.09
<i>Biomphalaria kuhniana</i>		0.00	0.03
<i>Biomphalaria straminea</i>		0.00	0.03
Interespecífica			
<i>Planorbis trivolvis</i>	<i>Helisoma duryi</i>	0.08	0.08
	<i>B. peregrina</i>	0.28	0.30
	<i>B. tenagophila</i>	0.22	0.23
	<i>B. schrammi</i>	0.22	0.26
	<i>B. oligoza</i>	0.28	0.29
	<i>B. amazonica</i>	0.23	0.25
	<i>B. glabrata</i>	0.25	0.26
	<i>B. intermedia</i>	0.25	0.28
	<i>B. kuhniana</i>	0.18	0.24
	<i>B. straminea</i>	0.17	0.27
<i>Helisoma duryi</i>	<i>B. peregrina</i>	0.26	0.30
	<i>B. tenagophila</i>	0.21	0.23
	<i>B. schrammi</i>	0.24	0.27
	<i>B. oligoza</i>	0.25	0.26
	<i>B. amazonica</i>	0.21	0.23
	<i>B. glabrata</i>	0.23	0.24
	<i>B. intermedia</i>	0.21	0.27
	<i>B. kuhniana</i>	0.19	0.21
	<i>B. straminea</i>	0.18	0.25
<i>Biomphalaria peregrina</i>	<i>B. tenagophila</i>	0.18	0.21
	<i>B. schrammi</i>	0.21	0.27

	<i>B. oligoza</i>	0.02	0.06
	<i>B. amazonica</i>	0.17	0.22
	<i>B. glabrata</i>	0.17	0.22
	<i>B. intermedia</i>	0.17	0.25
	<i>B. kuhniana</i>	0.16	0.22
	<i>B. straminea</i>	0.16	0.22
<i>Biomphalaria tenagophila</i>	<i>B. schrammi</i>	0.16	0.17
	<i>B. oligoza</i>	0.19	0.19
	<i>B. amazonica</i>	0.08	0.11
	<i>B. glabrata</i>	0.10	0.12
	<i>B. intermedia</i>	0.10	0.15
	<i>B. kuhniana</i>	0.07	0.09
	<i>B. straminea</i>	0.06	0.10
<i>Biomphalaria schrammi</i>	<i>B. oligoza</i>	0.21	0.24
	<i>B. amazonica</i>	0.18	0.22
	<i>B. glabrata</i>	0.17	0.19
	<i>B. intermedia</i>	0.19	0.24
	<i>B. kuhniana</i>	0.16	0.19
	<i>B. straminea</i>	0.16	0.21
<i>Biomphalaria oligoza</i>	<i>B. amazonica</i>	0.19	0.21
	<i>B. glabrata</i>	0.17	0.19
	<i>B. intermedia</i>	0.18	0.24
	<i>B. kuhniana</i>	0.17	0.19
	<i>B. straminea</i>	0.16	0.21
<i>Biomphalaria amazonica</i>	<i>B. glabrata</i>	0.10	0.13
	<i>B. intermedia</i>	0.08	0.13
	<i>B. kuhniana</i>	0.04	0.06
	<i>B. straminea</i>	0.03	0.10
<i>Biomphalaria glabrata</i>	<i>B. intermedia</i>	0.12	0.16
	<i>B. kuhniana</i>	0.09	0.11
	<i>B. straminea</i>	0.08	0.14
<i>Biomphalaria intermedia</i>	<i>B. kuhniana</i>	0.07	0.11
	<i>B. straminea</i>	0.06	0.11
<i>Biomphalaria kuhniana</i>	<i>B. straminea</i>	0.00	0.03

REFERÊNCIAS

- ABASCAL, F.; ZARDOYA, R.; TELFORD, M. J. TranslatorX: multiple alignment of nucleotide sequences guided by amino acid translations. **Nucleic Acids Research**, (38), W7–13, 2010.
- ADEMA et al. Whole genome analysis of a schistosomiasis-transmitting freshwater snail. **Nature communications**, 8, 15451, 2017.
- ALMEIDA, Y. M.; MENDONÇA, M. C. R. Suscetibilidade de *B. straminea* e *B. tenagophila* a duas cepas de *S. mansoni*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 19 (Supl): 65, 1986.
- ATTWOOD, S. W.; HUO, G. N.; QIU, J. W. Update on the distribution and phylogenetics of *Biomphalaria* (Gastropoda: Planorbidae) populations in Guangdong Province. **China Acta Tropica**, 1 (14): 258–270, 2015.
- AVISE, J.C; ELLIS, D. Mitochondrial DNA and the Evolutionary Genetics of Higher Animals. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, Series B, Biological Sciences, 312, 1154, 325–342, 1986.
- ÁLVAREZ, L. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 29 (3): 417–434, 2003.
- AMARISTA, M.A.S. Ecologia do gênero *Biomphalaria* e estrutura genética das populações de *Schistosoma mansoni* do Estado de Pernambuco. Tese, Recife, 159 f. 2010.
- BALDWIN, B.G. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: An example from the Compositae. **Molecular Phylogenetic Evolution**, 1, 3–16, 1992.
- BALDWIN, B.G.; SANDERSON, M.J.; PORTER, J.M.; WOJCIECHOWSKI, M.F.; CAMPBELL, C.S.; DONOGHUE, M.J. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, 82, 247–277, 1995.

BANDONI, S. M.; MULVEY, M.; LOKER, E. S. Phylogenetic analysis of eleven species of *Biomphalaria* Preston, 1910 (Gastropoda: Planorbidae) based on comparisons of allozymes. **Biological Journal of the Linnean Society**, (54):1–27, 1995.

BARBOSA, F.S. Competitive displacement of *Biomphalaria glabrata* by *B. straminea*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 82, (4): 139–141, 1987.

BARBOSA, C. S.; BARBOSA, F. S.; ARRUDA, F. Long-Term Controlled Field Experiment on the Competition Between Two Species of *Biomphalaria* (Mollusca, Basommatophora), the Snail Vectors of *Schistosoma mansoni* in Northeastern Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, 9 (2): 170–176, 1993.

BARBOSA, F.S.; COELHO, M.V.; Qualidades de vetor dos hospedeiros de *S. mansoni* no nordeste do Brasil. III. 1ª Suscetibilidade de *A. glabratus* e *T. centimentralis* à infestação por *S. mansoni*. **Publicações Avulsas do Instituto Aggeu Magalhães**, 3 (7): 79–92, 1954.

BARBOSA, F.S.; FIGUEIREDO, T. Susceptibility of the snail intermediate hosts os schistosomiasis from Northeastern Brazil to the infection with *Schistosoma mansoni*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 12 (3): 198–206, 1970.

BARBOSA, F. S.; PEREIRA DA COSTA, D. P.; ARRUDA, F. New field observations on the competitive displacement between two species of planorbid species living in northeastern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, (76): 361–366, 1981.

BARBOSA, F. S.; SANCHES, O.; BARBOSA, C. S.; ARRUDA, F. Dynamics of Snail Populations of *Biomphalaria glabrata* and *B. straminea* under Semi-Natural Conditions. **Caderno de Saúde Pública**, 8 (2): 157–167, 1992.

BARBOSA, N.D.; PIMENTEL-SOUZA, F.; SAMPAIO, I.B. The effect of seasonal temperature and experimental illumination on reproductive rate in the snail *Biomphalaria glabrata*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 20 (6): 685–96, 1987.

BILTON, D. T.; FREELAND, J. R.; OKAMURA, B. Dispersal in freshwater invertebrates. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, (32): 159–81, 2001.

BOROWIEC, M.L.; RABELING, C.; BRADY, S.G., FISHER, B.L.; SCHULTZ, T.R.; WARD, P.S. Compositional heterogeneity and outgroup choice influence the internal phylogeny of the ants. bioRxiv.:173393, 2017.

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)** – 2. ed. – 178 p. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Vigilância da Esquistossomose Mansonii: diretrizes técnicas** / Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – 4. ed. – 144 p. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

CALDEIRA, R. L.; VIDIGAL, T.; 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 do Instituto Oswaldo Cruz**, (93): 219–25, 1998.

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 Tropical**, (111): 1–6, 2009.

CAMPBELL, G. et al. Molecular evidence supports an African affinity of the Neotropical freshwater gastropod, *Biomphalaria glabrata*, Say 1818, an intermediate host for *Schistosoma mansoni*. **Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences**, (267): 2351–2358, 2000.

CARVALHO, O.S. Moluscos hospedeiros intermediários de *Schistosoma mansoni* do Brasil / Omar dos Santos Carvalho. - Belo Horizonte: Instituto Rene Rachou / Fundação Oswaldo Cruz, 2020, 124p.

CARVALHO, O.S.; AMARAL R.S.; DUTRA, L.V.; SCHOLTE, R.G.C.; GUERRA, M.A.M. Distribuição espacial de *Biomphalaria glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila*, hospedeiros intermediários de *Schistosoma mansoni* no Brasil. In: CARVALHO, OS.; COELHO, PMZ.; LENZI, HL. orgs. **Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar** [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2008, pp. 309–346. ISBN 978-85-7541-370-8. Disponível em: <<http://books.scielo.org>> (Acesso em: 22 fev. 2019).

CARVALHO, O.S.; JANNOTTI-PASSOS, LK.; CALDEIRA, RL. Importância epidemiológica e biologia molecular aplicada ao estudo dos moluscos do gênero *Biomphalaria*. In: CARVALHO, OS.; COELHO, PMZ.; LENZI, HL. orgs. **Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar** [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2008, pp. 309–346. ISBN 978-85-7541-370-8. Disponível em: <<http://books.scielo.org>> (Acesso em: 17 set. 2021).

CARVALHO, O.S.; ROCHA, R.S.; MASSARA, C.L.; KATZ, N. Primeiros casos autóctones de esquistossomose mansoni em região noroeste do Estado de Minas Gerais (Brasil). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 22 (3): 237–239, 1988.

COLEMAN, A. W. ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. **Trends in Genetics**, 19 (7): 370–375, 2003.

COSTA, M.J.F.S.; GRAULT, C. E.; CONFALONIERI, U.E.C. Comparative study of the fecundity and fertility of *B. glabrata* (Say,1818) and *B. straminea* (Dunker,1848) in laboratory through self-fertilization and cross-fertilization. **Memorias do Instituto Oswaldo cruz**, 99, 13–19, 2004.

CHEN et al. Validation of the ITS2 region as a novel DNA Barcode for identifying medicinal plant species. **PLoS ONE**, (5): 8613, 2010.

DARRIBA, D.; TABOADA, G. L.; DOALLO, R.; POSADA, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**, 9 (8): 772, 2012.

DAVIS, G. M. Snail hosts of Asian *Schistosoma* infecting man: evolution and coevolution. **Malacological Review**, (Suppl. 2): 195–238, 1980.

- DAVIS, G. M. Evolution of prosobranch snails transmitting Asian *Schistosoma*; coevolution with *Schistosoma*: a review. **Progress in Clinical Parasitology**, (3):145–204, 1992.
- DEJONG, R. J.; EMERY, A. M.; ADEMA, C. M. The mitochondrial genome of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda: Basommatophora), intermediate host of *Schistosoma mansoni*. **Journal of Parasitology**, 90 (5): 991–997, 2004.
- DEJONG, R.J. et al. Evolutionary Relationships and Biogeography of *Biomphalaria* (Gastropoda: Planorbidae) with Implications Regarding Its Role as Host of the Human Bloodfluke, *Schistosoma mansoni*. **Molecular Biology and Evolution**, 18 (12): 2225–2239, 2001.
- DIAS, L. C. S.; UETA, M. T.; GUERALDO, A. M. A. Suscetibilidade de *Biomphalaria glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila* a diferentes cepas de *Schistosoma mansoni*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 29 (4): 205–212, 1987.
- DUNKER, G. Diagnoses specierum novarum generis *Planorbis* collectionis Cumingianæ. **Proceedings of the Zoological Society of London**, (16): 40–43, 1848.
- FERNANDEZ, M. A.; PIERI, O. S. Infection by *Schistosoma mansoni* sambon 1907 in the first four months of life of *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 96 (Suppl), 2001.
- FERNANDEZ, M. A.; THIENGO, S. C. Susceptibility of *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) from Serra da Mesa Dam, Goiás, Brazil to Infection with Three Strains of *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 97 (Suppl.I), 2002.
- FIGUEROLA, J.; GREEN, A.J. How frequent is external transport of seeds and invertebrate eggs by waterbirds? A study in Donana, SW Spain. **Archiv fur Hydrobiologie**, 155, 557–65, 2002.
- FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEH, W.; LUTZ, R.; VRIJENHOEK, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan

invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, 3 (5): 294–299, 1994.

GOVEIA, C. O. Sequenciamento parcial do DNA mitocondrial de *Biomphalaria straminea* e análise comparativa com *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria tenagophila*. Dissertação de Mestrado, Belo Horizonte, 66 f., 2010.

GREGORY, T. R. Genome size estimates for two important freshwater molluscs, the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) and the schistosomiasis vector snail (*Biomphalaria glabrata*). **Genome**, 46 (5): 841–4, 2003.

HABIB, M. R.; SHAN, L. V.; GUO, Y. H.; GU, W. B.; STANDLEY, C. J.; CALDEIRA, R. L.; ZHOU, X.N. Morphological and molecular characterization of invasive *Biomphalaria straminea* in southern China. **Infectious Diseases of Poverty**, (7): 120, 2018.

HAAS, F. South American non-marine shells: further remarks and descriptions. **Fieldiana Zoology**, 34 (9): 107–132, 1952.

HAYES, K. A.; COWIE, R. H.; THIENGO, S. C. A global phylogeny of apple snails: Gondwanan origin, generic relationships, and the influence of outgroup choice (Caenogastropoda: Ampullariidae). **Biological Journal of the Linnean Society**, 98, 61–76, 2009.

HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; DE WAARD, J. R. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, 270 (1512): 313–321, 2003.

HEBERT, P. D. N.; RATNASINGHAM, S.; DE WAARD, J. R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, 270 (Suppl_1), S96–S99, 2003.

HOFFMANN, R. J.; BOORE, J. L.; BROWN, W. M. A Novel Mitochondrial Genome Organization for the Blue Mussel, *Mytilus edulis*. **Genetics**, (131): 397–412, 1992.

HUBENDICK, B.; REES, W. J. Phylogeny in the Planorbidae. **The Transactions of the Zoological Society of London**, 28 (6): 453–542, 1955.

JANNOTTI-PASSOS, L. K. Sequenciamento do DNA Mitocondrial de *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835) (Mollusca: Gastropoda), Tese de Doutorado, Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, 2007.

JANSEN, G. Sobre a validade do *Australorbis centimentralis* (Lutz, 1918). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, (40): 2, 1944.

JANSEN, G. Profilaxia experimental da esquistossomose de Manson. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, (44): 546–578, 1946.

KANE, R. A.; ROLLINSON, D. Repetitive sequences in the ribosomal DNA internal transcribed spacer of *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma intercalatum* and *Schistosoma mattheei*. **Molecular Biochemistry Parasitology**, (63): 153–156, 1994.

KATOH, K.; ROZEWICKI, J.; YAMADA, K. D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. **Briefings in bioinformatics**, 20 (4): 1160–1166, 2019.

KATZ, N. Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geohelminthoses. 22. ed. / Naftale Katz, Belo Horizonte, CPqRR, 76pp, (2018).

KIM, K.-J.; JANSEN, R. K. Comparisons of phylogenetic hypothesis among different data sets in dwarf dandelions (*Krigia*): Additional information from internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA. **Plant Systematics and Evolution**, 190, 157–185, 1994.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, (16): 111–120, 1980.

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, (35): 1547–1549, 2018.

LANFEAR, R.; HUA, X.; WARREN, D.L. Estimating the Effective Sample Size of tree topologies from Bayesian Phylogenetic Analyses. **Genome Biology and Evolution**, 8 (8): 2319–2332, 2016.

LUTZ, A. Caramujos de água doce do gênero *Planorbis*, observados no Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, (10): 65–82, 1918.

LUTZ, A. Moluscos de agua dulce recogidos y observados en Venezuela. In: *Estúdios de zoologia y parasitologia venezolanas*. Rio de Janeiro, p.75–89, 1928.

MAVAREZ, J.; STEINER, C.; POINTIER, J-P.; JARNE, P. Evolutionary history and phylogeography of the schistosome-vector freshwater snail *Biomphalaria glabrata* based on nuclear and mitochondrial DNA sequences. **Heredity**, (89): 266–272, 2002.

MONIS, P. T. The importance of systematics in parasitological research. **International Journal for Parasitology**, (29): 381–388, 1999.

MORITZ, C.; DOWLING, T.E.; BROWN, W.M. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 18 (1): 269–292, 1987.

NIXON, K.C.; CARPENTER, J.M. On Outgroups. **Cladistics**, (9): 413–426, 1993.

NOGUEIRA, R. T.; THIENGO, S. C.; FERNANDEZ, M. A. Morfological variations of *Biomphalaria straminea* populations from diferente Brazilian states. In **15th International Symposium on Schistosomiasis**, Rio de Janeiro, Brazil, 2018.

OHLWEILER, F. P.; ROSSIGNOLI, T. J.; PALASIO, R. G. S.; TUAN, R. Taxonomic diversity of *Biomphalaria* (Planorbidae) in São Paulo state, Brazil. **Biota Neotropica**, 20 (2): e20200975, 2020.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Schistosomiasis (Internet). World Health Organization. 2020. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis>> (Acesso em: 11 jun. 2020).

PALASIO, R. G. S.; GUIMARÃES, M. C. A.; OHLWEILER, F. P.; TUAN, R. Molecular and morphological identification of *Biomphalaria* species from the state of São Paulo, Brazil. **ZooKeys**, (668): 11–32, 2017.

PALASIO, R. G. S.; XAVIER, I. G.; CHIARAVALOTTI-NETO, F.; TUAN, R. Diversity of *Biomphalaria* spp. freshwater snails and associated mollusks in areas with

schistosomiasis risk, using molecular and spatial analysis tools. **Biota Neotropica**, 19 (4): 2019.

PARAENSE, W. L. Self and cross-fertilization in *Australorbis glabratus*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, (53): 285–91, 1955.

PARAENSE, W. L. Especiação nos animais, com particular referência aos moluscos planorbídeos. **Ciência e Cultura**, 9 (2): 57–62, 1957.

PARAENSE, W. L. Shell versus anatomy in planorbid systematic. I: “*Australorbis glabratus*”. **Revista Brasileira de Biologia**, (21): 163–170, 1961.

PARAENSE, W. L. ‘Fauna planorbídica do Brasil’. In C. S. Lacaz, R. G. Baruzzi e W. Siqueira Jr. (orgs.), **Introdução à geografia médica do Brasil**, São Paulo, Edgard Blücher/Edusp, 213–39, 1972.

PARAENSE, W. L. Estado atual da sistemática dos planorbídeos brasileiros. **Arquivos do Museu Nacional**, (55): 105–128, 1975.

PARAENSE, W. L. Distribuição dos caramujos no Brasil. In: Reis FA, Faria I e Katz N (eds), **Modernos Conhecimentos sobre Esquistossomose Mansônica**, Biblioteca da Academia Mineira de Medicina, Belo Horizonte, 1986.

PARAENSE, W. L. *Biomphalaria kuhniana* (Clessin, 1883), planorbid mollusc from South America. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 83 (1): 1–12, 1988.

PARAENSE, W. L. The Schistosome Vectors in the Americas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 96, Suppl.: 7–16, 2001.

PARAENSE, W. L.; DESLANDES, N. Studies on “*Australorbis centimentralis*”. **Revista Brasileira de Biologia**, 15 (3): 293–307 e (4) 341–348, 1955.

PARAENSE, W. L.; CORRÊA, L. R. A potential vector of *Schistosoma mansoni* in Uruguay. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 84 (3): 281–8, 1989.

PARAENSE, W. L.; DESLANDES, N. *Australorbis intermedius* sp. n. from Brazil. **Revista Brasileira de Biologia**, (22): 343–350, 1962.

PARODIZ, J. J. The tertiary non-marine mollusca of South America. *Annals of the Carnegie Museum*, (40): 1–242, 1969.

PELLON, A. B.; TEIXEIRA, I. Distribuição da esquistossomose mansônica no Brasil. Divisão da Organização Sanitária, Rio de Janeiro, 1950.

PENIDO, H. M.; PINTO, D. B.; DESLANDES, N. Observações sobre as posturas e o tempo de evolução de duas espécies de caramujos encontrados no Vale do Rio Doce. **Revista do Serviço Especial de Saúde Pública**, (4): 407–412, 1951.

PEPE, M. S. et al. *Biomphalaria* molluscs (Gastropoda: Planorbidae) in Rio Grande do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 104 (5): 783–786, 2009.

PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, A. Studies on the biology of *Australorbis glabratus*, schistosome-bearing Brazilian snail. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, 10 (4): 459–529, 1958.

PHILIPPE, H.; BRINKMANN, H.; LAVROV, D.V.; LITTLEWOOD, D.T.J.; MANUEL, M.; WÖRHEIDE, G.; BAURAIN, D. Resolving Difficult Phylogenetic Questions: Why More Sequences Are Not Enough. **PLOS Biology**, (9): e1000602, 2011.

PIERCE, H. The nonmarine mollusks of the late Oligocene–early Miocene Cabbage Patch fauna of western Montana III. Aquatic mollusks and conclusions. **Journal of Paleontology**, 67 (6): 980–993, 1993.

PILSBRY, H. A. Non-marine Mollusca of Patagonia. **Reports of the Princeton University expeditions to Patagonia**, 1896–1899 3 (5): 513–633, 1911.

PIMENTA, E. C. Fatores condicionantes da distribuição do planorbídeo *Biomphalaria* sp. Bacia do Ribeirão do Melo, MG. Dissertação, Ouro Preto, 183f., 2010.

PRESTON, H. B. Additions to the non-marine molluscan fauna of British and German East Africa and Lake Albert Edward. *The Annals and Magazine of Natural History*. (8) 6 (35): 526–536, 1910.

RAMBAUT, A. FigTree: tree figure drawing tool version 1.4.4. 2012. Disponível em: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/> (acesso em 10 de fevereiro de 2022).

RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A. J.; XIE, D.; BAELE, G.; SUCHARD, M. A. Posterior summarization in Bayesian Phylogenetics using Tracer 1.7. **Systematic Biology**, 67 (5): 901–904, 2018.

RIESEBERG, L. H.; WENDEL, J. F. Introgression and its consequences in plants. In: Harrison, R. (Ed.), **Hybrid Zones and the Evolutionary Process**. Oxford University Press, pp. 70–109, 1993.

RONQUIST, F. et al. MrBayes 3.2: efficient Bayesian Phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematics and Evolution**, 61 (3): 539–542, 2012.

ROZAS, J. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. **Molecular Biology and Evolution**, 34 (12): 3299–3302, 2017.

SILVA, C. A. Avaliação e retificação da identificação específica de moluscos do gênero *Biomphalaria* PRESTON, 1910 do acervo da Coleção de Malacologia Médica (Fiocruz-CMM). Dissertação de Mestrado. Belo Horizonte, 104 p., 2012.

SILVA, C. R. Identificação morfológica e molecular de espécies de *Biomphalaria* (Gastropoda: Planorbidae) na região do Alto Tietê. Trabalho de Conclusão de Curso, Instituto Federal de Ciências tecnológicas, São Paulo, 49f., 2013.

SOUZA, C. P.; RODRIGUES, M. S.; AZEVEDO, M. L. L.; ARAUJO, N. Suscetibilidade de populações de *B. straminea* (Dunker, 1848) de Minas Gerais, à infecção por *Schistosoma mansoni*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, (23): 212–216, 1981.

SOUZA, C.P.; JANNOTTI-PASSOS, L.K.; FREITAS, J.R. Degree of Host-parasite Compatibility between *Schistosoma mansoni* and their Intermediate Molluscan Hosts in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 90 (1): 5–10, 1995.

SPATZ, L.; VIDIGAL, T.H.D.A.; CALDEIRA, R.L.; DIAS NETO, E.; CAPPA, S.M.G.; CARVALHO, O.S. Study of *Biomphalaria tenagophila tenagophila*, *B. t. guaibensis* and *B. occidentalis* by polymerase chain reaction amplification and restriction enzyme digestion of the ribosomal RNA intergenic spacer regions. **Journal of Molluscan Studies**, (65):143–149, 1999.

SULLIVAN, J. T.; BRAMMER, S. R.; HARGRAVES, C.D.; OWENS, B.S. Heterotropic heart-transplants in *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Pulmonata): fate of xenografts from 7 pulmonate genera. **Invertebrate Biology**, (114): 151–160, 1995.

TAYLOR, D.W. Aspects of freshwater mollusc ecological biogeography. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, (62): 511–576, 1988.

TELES, H. M. S.; CARVALHO, O. S. Implicações da Biologia de *Biomphalaria* no Controle da Esquistossomose. In: **Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar** [online]. CARVALHO, O. S., COELHO, P. M. Z., and LENZI, H. L., orgs. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1124 p., 2008. ISBN 978-85-7541-370-8. <<http://books.scielo.org>> (Acesso em: 13 jun. 2021).

TELES, H. M. S. Distribuição de *Biomphalaria straminea* ao Sul da Região Neotropical, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, 30 (4): 341–9, 1996.

TEODORO, T. M. et al. Hybridism between *Biomphalaria cousini* and *Biomphalaria amazonica* and its susceptibility to *Schistosoma mansoni*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106 (7): 853–857, 2011.

THIENGO, S.C.; Fernandez, M.A. Moluscos Límnicos em Reservatórios de Usinas Hidrelétricas no Brasil: Aspectos Biológicos e Epidemiológicos. In: **Schistosoma mansoni e Esquistossomose: Uma Visão Multidisciplinar**, Fiocruz, 2008, pp. 437–457.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; Gibson, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, 22 (22): 4673–4680, 1994.

TUAN, R.; DOS SANTOS, P. ITS2 variability of *Biomphalaria* (Mollusca, Planorbidae) species from the Paranapanema Valley (São Paulo State, Brazil): Diversity patterns, population structure, and phylogenetic relationships. **Genetics and Molecular Biology**, 30, (1): 139–144, 2007.

TUAN, R.; OHLWEILER, F.P.; PALASIO, R.G.S.; ZANNA, R.D.; GUIMARAES, M.C.A. Pattern of Genetic Divergence of Mitochondrial DNA Sequences in

Biomphalaria tenagophila Complex Species Based on Barcode and Morphological Analysis. In: Rokni, M.B. (Ed.), Schistosomiasis. Tehran, Iran, Intech, 293–310, 2012.

VIDIGAL, T.H.D.A.; CALDEIRA, R.L.; SIMPSON A.J.G.; CARVALHO, O.S. Further Studies on the Molecular Systematics of *Biomphalaria* Snails from Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, 95 (1): 57–66, 2000a.

VIDIGAL, T.H.D.A.; KISSINGER, J.C.; CALDEIRA, R.L.; PIRES, E.R.; MONTEIRO, E.; SIMPSON A.J.G.; CARVALHO, O.S. Phylogenetic relationships among Brazilian *Biomphalaria* species (Mollusca: Planorbidae) based upon analysis of ribosomal ITS2 sequences. **Parasitology**, (121): 611–620, 2000b.

VIDIGAL, T.H.D.A.; SPATZ, L.; KISSINGER, J.C.; REDONDO, R.A.F.; PIRES, E.C.R.; SIMPSON A.J.G.; CARVALHO, O.S. Analysis of the First and Second Internal Transcribed Spacer Sequences of the Ribosomal DNA in *Biomphalaria tenagophila* Complex (Mollusca: Planorbidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 99 (2): 153–158, 2004.

VIDIGAL, T.H.D.A.; SPATZ, L.; NUNES, N.D; SIMPSON A.J.G.; CARVALHO, O.S.; DIAS NETO, E. *Biomphalaria* spp: Identification of the intermediate snail hosts of *Schistosoma mansoni* by polymerase chain reaction amplification and restriction enzyme digestion of the ribosomal RNA gene intergenic spacer. **Experimental Parasitology**, (89):180–187, 1998.

WENDEL, J.F.; SCHNABEL, A.; SEELANAN, T. Bidirectional interlocus concerted evolution following allopolyploid speciation in cotton (*Gossypium*). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 92, 280–284, 1995.

WOODRUFF, D. S., MULVEY, M. Neotropical schistosomiasis: African affinities of the host snail *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda: Planorbidae). **Biological Journal of the Linnean Society**, (60): 505–516, 1997.

WRIGHT, C. A. Generic nomenclature of the intermediate hosts of *Schistosoma mansoni*. *Nature*, (183): 906–907, 1959.

YANG, Y. et al. Prediction of the potential global distribution for *Biomphalaria straminea*, an intermediate host for *Schistosoma mansoni*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 12 (5): e0006548, 2018.

YIPP, M. W. Distribution of the schistosome vector snail, *Biomphalaria straminea* (Pulmonata: Planorbidae) in Hong Kong. **Journal of Molluscan Studies**, (56): 47–55, 1990.

ZHANG, S. M.; BU, L.; LAIDEMITT, M. R.; LU, L.; MUTUKU, M. W.; MKOJI, G. M.; LOKER, E. S.; Complete mitochondrial and rDNA complex sequences of important vector species of *Biomphalaria*, obligatory hosts of the humaninfecting blood fuke, *Schistosoma mansoni*. **Scientific Reports**, (8): 7341, 2018.