

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Investigação da ocorrência de *Biomphalaria cousini* no Brasil
e sua suscetibilidade ao *Schistosoma mansoni*.

Tatiana Maria Teodoro

Belo Horizonte
Fevereiro de 2009

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Investigação da ocorrência de *Biomphalaria cousini* no Brasil
e sua suscetibilidade ao *Schistosoma mansoni*.

por

Tatiana Maria Teodoro

Dissertação apresentada com vistas à
obtenção do Título de Mestre em
Ciências na área de concentração
Biologia Celular e Molecular.

Orientação: Roberta Lima Caldeira

Co-Orientação: Omar Santos Carvalho
Liana Konovalof Janotti-Passos

Belo Horizonte
Fevereiro de 2009

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

T314i Teodoro, Tatiana Maria.
2009

Investigação da ocorrência de *Biomphalaria cousini* no Brasil e sua suscetibilidade ao *Schistosoma mansoni* / Tatiana Maria Teodoro. – Belo Horizonte, 2009.

xiii, 82 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f.: 85 - 95

Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. Esquistossomose mansoni/transmissão 2.
Schistosoma mansoni/parasitologia 3.
Biomphalaria/parasitologia 4. Filogenia I. Título. II.
Caldeira, Roberta Lima (Orientação) III. Janotti-Passos,
Liana Konovaloff (Co-orientação) IV. Carvalho, Omar dos
Santos (Co-orientação)

CDD – 22. ed. – 616.963

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Investigação da ocorrência de *Biomphalaria cousini* no Brasil
e sua suscetibilidade ao *Schistosoma mansoni*.

por

Tatiana Maria Teodoro

**Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes
membros:**

Prof. Dra. Roberta Lima caldeira (Presidente)

Prof. Dra.Silvana Aparecida Rogel Carvalho Thiengo

Prof. Dra.Célia Maria Ferreira Gontijo

Suplentes: Dr.Jerônimo Conceição Ruiz

Dissertação defendida e aprovada em: 16/02/2009

AGRADECIMENTOS

A Deus porque sem ele nada em minha vida seria possível.

Aos meus pais, que muito batalharam e de algumas coisas se privaram para que eu pudesse ter uma boa educação. Também pelo amor, apoio e incentivo, mesmo nos momentos mais difíceis. Exemplos de caráter e honestidade sempre.

A todos os meus familiares que me incentivaram e me ajudaram de alguma forma.

Ao meu noivo e amor da minha vida Antônio, pelo amor, carinho, companheirismo e apoio incondicional em todos os momentos que passei e pelos que ainda virão por toda minha vida. Também por ter sido paciente nos momentos em que eu não conseguia ser.

A Dra. Roberta Lima Caldeira, pela confiança, amizade, exemplo de dedicação ao trabalho e, sobretudo pela orientação desde a iniciação científica.

Ao Dr. Omar dos Santos Carvalho, pela confiança e também pelas oportunidades que me foram oferecidas.

A Dra. Liana Konovalof Jannotti Passos, pela amizade, conselhos, incentivos e também pelas valiosas sugestões.

A equipe do Moluscário, pela ajuda na criação e infecção dos caramujos. Com elas tive a oportunidade de aprender muito.

Aos colegas do Laboratório de Helminologia e Malacologia Médica, especialmente a Christiane Goveia, pelas conversas, apoio e amizade sempre.

A Fernanda Dias, pela ajuda, amizade e incentivo. Também por ter se mostrado prestativa em todos os momentos em que precisei.

A equipe do Biotério, pela ajuda e colaboração sempre que necessário.

A equipe do laboratório de Malária e de Parasitologia Celular e Molecular pela ajuda, colaboração e disponibilidade e em especial para a Elisângela pela grande ajuda com o sequenciador MegaBAce.

As minhas amigas Paty, Lu, Ana e Cris pela amizade e momentos divertidos que temos vivido. Sei que posso sempre contar com vocês.

A Pós-Graduação do Centro de Pesquisas René Rachou, pela disponibilidade deste curso.

À Biblioteca do CPqRR em prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrante do rol de referências desta dissertação, também pela catalogação e normalização da mesma.

Ao Centro de Pesquisas René Rachou e a Fapemig pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE TABELAS.....	X
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XI
RESUMO.....	XII
ABSTRACT.....	XIII
1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Considerações gerais.....	15
1.2 O gênero <i>Biomphalaria</i>	17
1.2.1 Noções sobre a biologia dos moluscos do gênero <i>Biomphalaria</i>	19
1.2.2 Suscetibilidade dos moluscos do gênero <i>Biomphalaria</i> ao <i>S. mansoni</i>	21
1.2.3 Identificação morfológica dos moluscos do gênero <i>Biomphalaria</i>	22
1.2.3.1 Identificação morfológica de <i>Biomphalaria amazonica</i>	24
1.2.3.2 Identificação morfológica de <i>Biomphalaria cousini</i>	26
1.2.3.3 Distinção morfológica de <i>B. amazonica</i> e <i>B. cousini</i>	28
1.3 Biologia molecular.....	28
1.3.1 Região espaçadora transcrita interna do rDNA.....	29
1.3.2 Gene 16S do rDNA mitocondrial.....	29
1.3.3 Taxonomia molecular dos moluscos brasileiros do gênero <i>Biomphalaria</i>	30
1.4 Filogenia.....	30
1.4.1 Inferências filogenéticas dos moluscos do gênero <i>Biomphalaria</i>	34
2 OBJETIVOS.....	37
2.1 Objetivo geral.....	38
2.2 Objetivos específicos.....	38
3 METODOLOGIA.....	39
3.1 Identificação morfológica.....	40
3.1.1 Amostras.....	40
3.1.2 Metodologia.....	40
3.2 PCR-RFLP.....	40
3.2.1 Amostras.....	40
3.2.2 Metodologia.....	40
3.2.2.1 Extração de DNA.....	40

3.2.2.2 PCR específico direcionado para a região ITS- rDNA.....	41
3.2.2.3 RFLP	42
3.3 Sequenciamento e Filogenia.....	42
3.3.1 Amostras.....	42
3.3.2 Metodologia.....	45
3.3.2.1 Amplificação do DNA.....	45
3.3.2.2 Purificação do produto da PCR.....	45
3.3.2.3 Reação de Sequenciamento.....	46
3.3.2.4 Confirmação das sequências.....	47
3.3.2.5 Análise das sequências.....	47
3.3.2.5.1 O programa Phred-Phrap-Consed.....	47
3.3.2.5.2 Alinhamento das sequências.....	47
3.3.2.5.3 Inferência filogenética.....	47
3.4 Desafio com cepas de <i>Schistosoma mansoni</i>	48
3.4.1 Amostras.....	48
3.4.2 Metodologia.....	49
3.4.2.1 Obtenção da cepa LE de <i>S. mansoni</i>	49
3.4.2.2 Infecção dos moluscos.....	49
3.4.2.3 Exame dos moluscos.....	50
3.5 Verificação da presença de híbridos por cruzamento.....	50
3.5.1 Amostras.....	50
3.5.2 Metodologia.....	51
4 RESULTADOS.....	52
4.1 Identificação morfológica.....	53
4.2 PCR-RFLP	54
4.2.1 Amplificação da região ITS- rDNA.....	54
4.2.2 Produção dos perfis de restrição da região ITS-rDNA.....	54
4.3 Sequenciamento e Filogenia.....	55
4.3.1 Amplificação da região ITS2- rDNA.....	55
4.3.2 Amplificação de parte da região 16S do rDNAm.....	55
4.3.3 Purificação e sequenciamento.....	56
4.3.4 Análise das sequências.....	56
4.4 Desafio com cepa de <i>S. mansoni</i>	62

4.4.1 Infecção dos moluscos.....	62
4.5 Verificação da presença de híbridos por cruzamento.....	62
5 DISCUSSÃO.....	64
6 CONCLUSÕES.....	71
7 ANEXOS.....	73
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Diagrama representativo dos perfis espécie-específicos das dez espécies e uma sub-espécie brasileiras do gênero <i>Biomphalaria</i>	15
FIGURA 2: Gel de poliacrilamida 6% mostrando os perfis de restrição obtidos por Caldeira et al. ³	16
FIGURA 3: Molusco do gênero <i>Biomphalaria</i> com desova.....	21
FIGURA 4: Concha de <i>Biomphalaria amazonica</i>	24
FIGURA 5: Sistema genital de <i>Biomphalaria amazonica</i>	25
FIGURA 6: Concha de <i>Biomphalaria cousini</i>	26
FIGURA 7: Sistema genital de <i>Biomphalaria cousini</i>	27
FIGURA 8: Árvore filogenética de espécies do gênero <i>Biomphalaria</i> utilizando a região espaçadora transcrita interna dois (ITS2) do rDNA por Vidigal et al ⁵ ..	34
FIGURA 9: Árvore filogenética de espécies do gênero <i>Biomphalaria</i> utilizando dados combinados das regiões ITS do rDNA e parte da região 16S do rDNAm por DeJong et al. ⁶	35
FIGURA 10: Árvore filogenética de espécies do gênero <i>Biomphalaria</i> utilizando-se dados combinados das regiões ITS do rDNA por Estrada et al. ⁷	36
FIGURA 11: Esquema da região espaçadora transcrita interna do rDNA.....	41
FIGURA 12: Gel de poliacrilamida 6% mostrando os perfis de PCR-RFLP de moluscos do gênero <i>Biomphalaria</i>	54
FIGURA 13: Gel de agarose 1% mostrando a amplificação da região ITS2 do rDNA de moluscos do gênero <i>Biomphalaria</i>	55
FIGURA 14: Gel de agarose 1% mostrando a amplificação de parte da região 16S do rDNAm de moluscos do gênero <i>Biomphalaria</i>	55
FIGURA 15: Árvore gerada pelo método de distância NJ utilizando-se dados combinados das regiões ITS2 do rDNA e parte da região 16S do rDNAm.....	57
FIGURA 16: Árvore gerada pelo método MP utilizando-se dados combinados das regiões ITS2 do rDNA e parte da região 16S do rDNAm.....	59
FIGURA 17: Árvore gerada pelo método ML utilizando-se dados combinados das regiões ITS2 do rDNA e parte da região 16S do rDNAm.....	61
FIGURA 18: Gel de poliacrilamida 6% mostrando os perfis de restrição obtidos de filhotes provenientes de cruzamento entre <i>B. amazonica</i> e <i>B. cousini</i>	63

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Moluscos do gênero <i>Biomphalaria</i> , sua distribuição geográfica e suscetibilidade ao <i>Schistosoma mansoni</i>	18
TABELA 2: Caracteres diagnósticos que distinguem <i>B. amazonica</i> de <i>B. cousini</i>	28
TABELA 3: Amostras utilizadas na identificação morfológica.....	40
TABELA 4: Amostras utilizadas nos estudos de filogenia.....	43
TABELA 5: Amostras utilizadas no teste de suscetibilidade.....	49
TABELA 6: Infecção individual de moluscos <i>Biomphalaria</i> com <i>S. mansoni</i> - Cepa LE.....	50
TABELA 7: Amostras utilizadas para verificação da presença de híbridos.....	51
TABELA 8: Características da anatomia de <i>B. amazonica</i> , <i>B. cousini</i> e híbridos.....	53
TABELA 9: Resultado da infecção dos moluscos com a cepa LE de <i>S. mansoni</i>	62

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA	deoxyribonucleic acid; ácido desoxirribonucleico
rDNA	Ribosomal deoxyribonucleic acid; ácido desoxirribonucleico ribossomal
rDNAmt	Ribosomal deoxyribonucleic acid mitochondrial; ácido desoxirribonucleico ribossomal mitocondrial
dNTP	deoxynucleotide triphosphate; deoxinucleotídeo trifosfato
EDTA	ethylenediaminetetracetic acid; ácido etilendiaminotetracético
ITS	internal transcribed spacer; espaçadores transcritos internos
ITS1	Internal transcribed spacer 1; espaçadores transcritos internos 1
ITS2	internal transcribed spacer 2; espaçadores transcritos internos 2
PB	pares de bases
PCR	polymerase chain reaction; reação em cadeia da polimerase
RFLP	restriction fragments length polymorphisms; polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição
Taq	DNA polimerase termostável derivada da bactéria <i>Thermus aquaticus</i>
OTUs	operational taxonomic unit; unidades taxonômicas operacionais
UPGMA	Unweighted pair group method with arithmetic means; agrupamento de pares não ponderados, baseados na média aritmética
NJ	Neighbor Joining; agrupamento de vizinhos
MP	Maximum parsimony; máxima parcimônia
ML	Maximum likelihood; máxima verossimilhança
IB	Bayesian inference; inferência Bayesiana

RESUMO

No Brasil existem dez espécies e uma subespécie de moluscos do gênero *Biomphalaria* sendo três hospedeiras intermediárias do *Schistosoma mansoni*, *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*. As espécies *B. peregrina* e *B. amazonica* são hospedeiras em potencial deste parasito. A identificação morfológica destes moluscos pode ser dificultada pela semelhança e extensa variação intraespecífica observada nos caracteres utilizados na identificação. Nestes casos, técnicas moleculares auxiliam a classificação. Estudos prévios utilizando a reação em cadeia da polimerase associada ao polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (PCR-RFLP) detectaram três perfis distintos para *B. amazonica*. Além disso, outros autores observaram variação intraespecífica entre espécimes de *B. amazonica* do Brasil e da Bolívia a partir da análise de sequências das regiões ITS do rDNA e parte da região 16S do rDNA mitocondrial. Neste contexto, o objetivo desse trabalho foi verificar se as diferenças observadas correspondem às espécies *B. amazonica* e *B. cousini*. Neste estudo foram utilizadas populações de *Biomphalaria* oriundas do Brasil (Amazonas e Mato Grosso), Colômbia (Letícia) e Bolívia (Santa Cruz). Estes moluscos foram identificados morfológicamente e realizou-se a técnica da PCR-RFLP. Em seguida as regiões 16S rDNAmt e ITS2 rDNA foram seqüenciadas, comparadas entre si e com sequencias de moluscos do gênero *Biomphalaria*, disponíveis no Genbank. Além disso, experimentos de cruzamento foram realizados entre essas duas espécies para verificar a presença de híbridos e *B. cousini* foi submetida a experimentos de suscetibilidade ao *S. mansoni*. A morfologia dos exemplares da Bolívia e da Colômbia coincidiu com aquelas descritas para *B. amazonica* e *B. cousini*, respectivamente. Os exemplares do Brasil apresentaram morfologia predominantemente de *B. amazonica*. Os resultados da PCR-RFLP evidenciaram que os exemplares da Bolívia apresentaram perfil distinto daquele apresentado pelos exemplares da Colômbia e os exemplares do Brasil apresentaram três perfis diferentes: o boliviano, o colombiano e o híbrido, contendo a mistura dos fragmentos dos dois perfis anteriores. As análises filogenéticas mostraram que as populações com perfil colombiano formam um grupo distinto com valor significativo de *bootstrap*. Além disso, *B. cousini* mostrou ser suscetível ao *S. mansoni* e o cruzamento entre as duas espécies mostrou que elas produzem híbridos. Esses resultados confirmam a ocorrência de *B. cousini* no Brasil e apontam para o risco de introdução da esquistossomose mansônica em novas áreas.

ABSTRACT

In Brazil, there are ten species and one sub-species of molluscs of the genus *Biomphalaria*, being three intermediate snail hosts of trematode *Schistosoma mansoni*, *B. glabrata*, *B. tenagophila* and *B. straminea*. The species *B. peregrina* and *B. amazonica* have been regarded as potential hosts of the parasite. The morphological identification of the snails of this genus can be difficult due the high similarity degree and large intraspecific variation observed in characters used in identification. In these cases, molecular techniques have been used to help the identification. Previous studies using the Polymerase Chain Reaction and Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) showed three variant molecular profiles to *B. amazonica*. In addition, other authors evidenced intraspecific variations in Brazilian specimens of *B. amazonica* snails and in one Bolivian specimen using sequence data of the regions ITS of rDNA and partial mitochondrial ribosomal 16S. In this context, the aim of the present work was to verify whether such differences would correspond to either *B. amazonica* or *B. cousini*. In this research, *Biomphalaria* snails from Brazil (Amazonas and Mato Grosso), Colombia (Leticia) and Bolivia (Santa Cruz) were used. These snails were identified morphologically and PCR-RFLP technique was carried out. Furthermore, the 16S of the rDNAmt and ITS2 of rDNA regions were sequenced to evaluate variations in such populations, comparing them with other species of the genus. Besides, crosses experiments were done between these two species, to verify if they would generate hybrids and, *B. cousini* snails were submitted to susceptibility experiments to *S. mansoni*. Noteworthy, morphological data of Bolivian and Colombian specimens coincided with those for *B. amazonica* and *B. cousini*, respectively. Brazilian snail specimens predominantly showed the morphology described for *B. amazonica*. PCR-RFPL results evidenced that the Bolivian specimens showed a distinct profile when compared with that of Colombian specimens. Brazilian specimens exhibited three different profiles, the Bolivian, the Colombian and a hybrid with the mix of the fragments of two previous. Phylogenetic analyses showed that the populations with the Colombian profile were clustered together, which was supported by significant bootstrap values. Furthermore, *B. cousini* showed to be susceptible to *S. mansoni* and crosses between *B. amazonica* and *B. cousini* showed that they were able to generate hybrids. These results confirm the occurrence of *B. cousini* in Brazil and points to the risk of introduction of schistosomiasis mansoni into new areas.

1.1 Considerações gerais

A esquistossomose é uma doença transmissível, parasitária, provocada pelo trematódeo do gênero *Schistosoma* (Trematoda: Schistosomatidae). No Brasil, a esquistossomose mansônica, cujo agente etiológico é *Schistosoma mansoni* (Sambon 1907), é endêmica em vasta extensão do território e considerada um grave problema de saúde pública, uma vez que provoca anualmente expressivo número de formas graves e óbitos. A presença do hospedeiro intermediário, moluscos do gênero *Biomphalaria* (Gastropoda: Planorbidae) constitui condição necessária e indispensável para que se desenvolva o ciclo do parasita. O estudo destes hospedeiros é importante para que se possa interpretar o papel que possuem na transmissão da doença e se possa orientar medidas de controle, adequadas a cada localidade, dirigidas aos caramujos.

Estudos morfológicos de identificação de moluscos do gênero *Biomphalaria* com ênfase no sistema reprodutor são amplamente utilizados na diferenciação entre espécies. Esta diferenciação pode ser dificultada devido às similaridades fenotípicas, tamanho dos exemplares e inadequados processos de fixação¹.

Técnicas moleculares vêm amplamente sendo utilizadas como uma ferramenta auxiliar a morfologia para tentar resolver estes problemas. Com o objetivo de caracterizar espécies brasileiras do gênero *Biomphalaria* Vidigal et al.² utilizando a reação em cadeia da polimerase associada ao polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (PCR-RFLP) com a enzima *Ddel*, observaram três perfis distintos para *B. amazonica* oriundos de uma mesma localidade ou de localidades distintas (Figura 1).

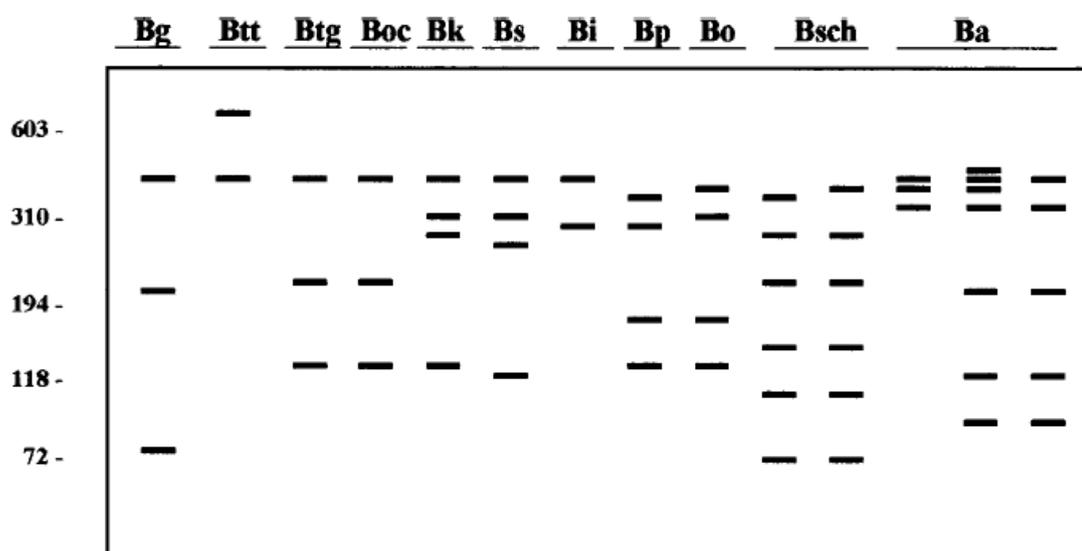


FIGURA 1: Diagrama representativo dos perfis espécie-específicos das dez espécies e uma subespécie brasileiras do gênero *Biomphalaria*. **Bg:** *Biomphalaria glabrata*, **Btt:** *B. tenagophila tenagophila*, **Btg:** *B.t. guaibensis*, **Boc:** *B. occidentalis*, **Bk:** *B. kuhniana*, **Bs:** *B. straminea*, **Bi:** *B. intermedia*, **Bp:** *B. peregrina*, **Bo:** *B. oligoza*, **Bsch :** *B. schrammi*, **Ba:** *B. amazonica*. Os valores à esquerda do gel correspondem ao peso molecular ².

Caldeira et al.³ utilizando um maior número de exemplares oriundos da Colômbia, Bolívia e Brasil previamente identificados como *B. amazonica* realizaram um estudo morfológico e molecular desses moluscos. Foram observados três perfis moleculares (Figura 2). Entretanto, a morfologia dos exemplares oriundos da Bolívia correspondia à descrição de Paraense ⁴ para *B. amazonica* e apresentava o perfil molecular com cinco fragmentos (Figura 2, canaleta 3). Os exemplares oriundos da Colômbia apresentaram morfologia igual à de *B. cousini*, descrita por Paraense ⁴ e perfil molecular de três fragmentos (Figura 2, canaletas 1 e 2). Enquanto os exemplares cujo perfil molecular de nove fragmentos incluíram os perfis “colombiano” e os “boliviano” (Figura 2, canaletas 5, 6 e 7) apresentaram morfologia predominantemente de *B. amazonica* e esporadicamente de *B. cousini*. A partir disso, foi sugerido que o perfil molecular de *B. amazonica* é o de cinco fragmentos, o de *B. cousini* três e o de nove correspondia a um híbrido destas duas espécies.

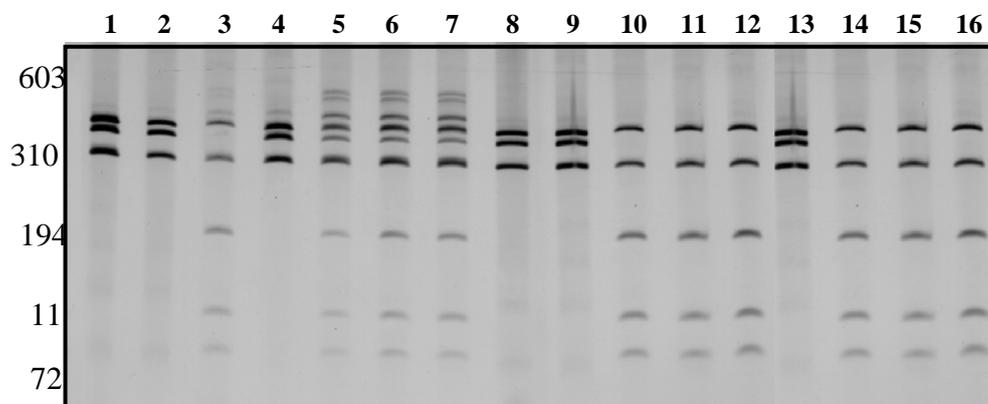


Figura 2: Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata mostrando os perfis de restrição obtidos após digestão da região ITS do rDNA com a enzima *Ddel* de *Biomphalaria* oriundos de: Canaletas 1-2: Letícia (Colômbia); 3: Santa Cruz (Bolívia); 4-6: Município de Barão de Melgaço/MT (Brasil); 7-13: Município de Careiro da Várzea/AM (Brasil); 14-16: Município de Manaus/AM (Brasil). Os valores à esquerda do gel correspondem ao peso molecular ³.

Estudos das relações filogenéticas dos moluscos do gênero *Biomphalaria* ⁵⁻⁷ também indicaram diferenças nas populações previamente identificadas como *B. amazonica* (Figuras 8, 9 e 10).

Em decorrência das variações observadas na morfologia, taxonomia molecular e filogenia das populações previamente identificadas como *B. amazonica* surgiu a necessidade de aprofundar os estudos dessas populações, abrangendo morfologia, relações filogenéticas com as outras espécies do gênero e o seu status de suscetibilidade. Principalmente porque *B. cousini*, foi relatada, até o momento, somente para o Equador, não havendo relato de sua presença fora deste país e o fato de *B. amazonica* ser hospedeira em potencial do *Schistosoma mansoni*. Assim se nossas especulações estiverem corretas a fauna planorbídica brasileira será acrescida de mais uma espécie.

1.2 O Gênero *Biomphalaria*

Os moluscos do gênero *Biomphalaria* pertencem à família Planorbidae diferenciando-se dos demais por apresentarem concha discoidal em espiral plana (planispiral), com os lados aproximadamente paralelos, orifícios genitais localizados do lado esquerdo do corpo e os tentáculos finos e longos. O termo *Biomphalaria* vem do latim *bis*: duas vezes + do grego *omphalos*: umbigo, em referência ao aprofundamento do giro central dos dois lados da concha. A abertura da concha varia de acordo com a espécie e os giros são esculpados apenas com estrias de crescimento⁸.

No mundo existem 36 espécies e uma subespécie de moluscos do gênero *Biomphalaria* distribuídas na América do Sul, Caribe, América Central, sul dos Estados Unidos da América e diversas regiões da África. Dessas, nove espécies são consideradas suscetíveis, oito infectaram-se experimentalmente, nove são refratárias e as demais não foram estudadas quanto à suscetibilidade ao *Schistosoma mansoni* (tabela 1).

Tabela 1: Moluscos do gênero *Biomphalaria*, sua distribuição geográfica e suscetibilidade ao *Schistosoma mansoni*

Espécie	Distribuição geográfica	Suscetibilidade ao <i>Schistosoma mansoni</i>
<i>B. glabrata</i> (Say, 1818)	Antígua, Brasil, Curaçau, Dominica, Egito, Guadalupe, Guiana Francesa, Haiti, Ilhas Saint Kitts, Martinica, Montserrat, Nigéria, Porto Rico, República Dominicana, Saint Martin, Santa Lúcia, São Cristóvão, Suriname, Venezuela, Vieques	SUSC
<i>B. pfeifferi</i> (Krauss, 1848)	África do Sul (localidade-tipo); Argélia, Angola, Botsuana, Camarões, Chade, Congo, Daomé (atual Benin), Etiópia, Gabão, Gâmbia, Gana, Guiné, Libéria, Líbia, Madagascar, Malawi, Moçambique, Nigéria, Quênia, República Centro-Africana, Rodésia, Senegal, Serra Leoa, Somália, Suazilândia, Sudão, Tanzânia, Transvaal, Uganda, Zaire, Zâmbia	SUSC
<i>B. alexandrina</i> (Ehrenberg, 1831)	Egito, Sudão	SUSC
<i>B. sudanica</i> (Martens, 1870)	Sudão, Uganda, Etiópia, Quênia, Tanzânia, Zaire, Zâmbia	SUSC
<i>B. straminea</i> (Dunker, 1848)	Venezuela, Suriname, Guiana Francesa, Guiana, Peru, Brasil, Paraguai, Argentina, Dominica, Granada, Guadalupe, Martinica, República Dominicana, Trinidad, Uruguai, Costa Rica e China	SUSC
<i>B. tenagophila</i> (Orbigny, 1835)	Argentina, Paraguai, Uruguai, Brasil, Peru, Bolívia e República Democrática do Congo	SUSC
<i>B. choanomphala</i> (Martens, 1879)	Tanzânia, Uganda, Quênia	SUSC
<i>B. camerunensis</i> (Boettger, 1941)	Mongongo, Camarões, Gana, Nigéria, República Centro-Africana, Zaire	SUSC
<i>B. prona</i> (Martens, 1873)	Venezuela	SUSC
<i>B. amazonica</i> Paraense, 1966	Brasil, Bolívia e Colômbia	SE
<i>B. peregrina</i> (Orbigny, 1835)	Equador, Bolívia, Chile, Brasil, Paraguai, Peru, Uruguai, Argentina e Colômbia	SE
<i>B. aff. straminea</i> Paraense & Corrêa, 1989	Espinillar, Uruguai	SE
<i>B. havanensis</i> (Pfeiffer, 1839)	Haiti, Porto Rico (EUA), Cuba, Venezuela	SE
<i>B. helophila</i> (Orbigny, 1835)	Peru, Cuba, Costa Rica, Guatemala, Belize, Haiti, México, Saint Thomas, Costa Rica, El Salvador, República Dominicana, Porto Rico, Barbados e Nicarágua	SE
<i>B. stanleyi</i> (Smith, 1888)	Congo, Uganda, Chade, Ruanda	SE
<i>B. sericea</i> (Dunker, 1848)	Equador	SE
<i>B. smithi</i> Preston, 1910	Uganda	SE
<i>B. obstructa</i> (Morelet, 1849)	Estados Unidos, México, Porto Rico, Guatemala, El Salvador, Belize e Cuba	REF
<i>B. intermedia</i> Paraense & Deslandes, 1962	Brasil e Argentina	REF
<i>B. occidentalis</i> Paraense, 1981	Brasil, Paraguai e Argentina	REF
<i>B. oligoza</i> Paraense, 1974	Bolívia, Brasil e Argentina	REF
<i>B. tenagophila guaibensis</i> Paraense, 1984	Brasil, Uruguai e Argentina	REF
<i>B. kuhniiana</i> (Clessin, 1883)	Suriname, Brasil, Venezuela, Panamá e Colômbia	REF
<i>B. schrammi</i> (Crosse, 1864)	Guiana Francesa, Guadalupe e Brasil	REF
<i>B. orbignyi</i> Paraense, 1975	Argentina e Uruguai	REF
<i>B. trigyra</i> (Philippi, 1869)	Peru e Equador	REF
<i>B. hermanni</i> (Boettger, 1910)	Namíbia	SI
<i>B. germaini</i> (Ranson, 1953)	Argélia	SI
<i>B. gaudi</i> (Ranson, 1953)	Dakar	SI
<i>B. angulosa</i> Mandahl-Barth, 1957	Tanzânia, Malawi, Zâmbia	SI
<i>B. temascalensis</i> (Rangel-Ruiz, 1987)	México	SI
<i>B. subprona</i> (Martens, 1899)	México e Guatemala	SI
<i>B. andecola</i> (Orbigny, 1835)	Bolívia, Peru e Chile	SI
<i>B. equatorial</i> (Cousin, 1887)	Equador	SI
<i>B. cousini</i> Paraense, 1966	Equador	SI
<i>B. nicaraguana</i> (Morelet, 1851)	Nicarágua	SI
<i>B. edisoni</i> Estrada et al., 2006	Colômbia	SI

Suscetível = SUSC; Refratária = REF; Suscetível experimentalmente = SE; Sem informação = SI ⁹ modificado.

Destas, dez espécies e uma subespécie são encontradas no Brasil sendo elas: *B. glabrata*; *B. tenagophila*; *B. straminea*; *B. peregrina*; *B. schrammi*; *B. kuhniiana*; *B. intermedia*; *B. amazonica*; *B. oligoza*; *B. occidentalis* e *B. t. guaibensis*. Destas somente *B. glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila* foram encontradas naturalmente infectadas pelo *S. mansoni*, enquanto, *B. peregrina* e *B. amazonica* foram infectadas experimentalmente em laboratório, sendo consideradas hospedeiro em potencial do parasito¹⁰⁻¹¹.

1.2.1 Noções sobre a biologia dos moluscos do gênero *Biomphalaria*

Moluscos do gênero *Biomphalaria* ocupam vastas áreas geográficas impedindo generalizações sobre a caracterização ecológica dos criadouros nessas diferentes áreas. Eles podem ser encontrados em uma grande variedade de habitats aquáticos como, por exemplo, pequenas coleções de água doce, naturais ou artificiais, com velocidade inferior a 30 cm/s, temperatura média entre 20°C e 25°C sendo seus ovos depositados sob folhagens aquáticas. Estes moluscos tendem a ocorrer em locais onde haja vegetais aquáticos, restos de animais e vegetais em decomposição, algas, bactérias e microorganismos presentes no limo que se formam nas superfícies cobertas pela água, pois tais substratos constituem sua fonte de alimento¹².

Fortes pressões do ambiente são constantes e por isso existem populações de moluscos adaptadas a diferentes condições ambientais podendo tolerar grandes variações nas características físicas, químicas e biológicas do ambiente em que vivem. Esses moluscos desenvolveram inúmeros mecanismos de sobrevivência e escape como a brusca parada no desenvolvimento, controlada por fatores internos, mesmo quando as condições do meio são favoráveis (diapausa), ou determinadas diretamente por condições desfavoráveis do meio (quiescência), manifestando-se na forma de estivação, no qual ocorre a parada do desenvolvimento induzida pela elevação da temperatura, ou pela hibernação onde ocorre o abaixamento da temperatura a um nível que faz cessar todo desenvolvimento. Além disso, estes moluscos são capazes de se enterrarem no solo dos ambientes aquáticos e fora deles, devido à formação de ambientes aquáticos temporários como poças d'água formadas por chuvas ou inundações que vão ressecando lentamente¹². Uma característica relevante desses caramujos é a sua habilidade de sobreviver fora da

água por períodos relativamente longos, resistência a dessecação, caso essa ocorra de forma lenta ¹³. Esta sobrevivência vai depender da capacidade do molusco em conservar recursos como água, oxigênio e energia e neutralizar os produtos tóxicos do metabolismo. Entretanto, se retirados da água e expostos a uma rápida dessecação, morrem em pouco tempo ¹⁴. A sobrevivência na natureza das bionfalárias não ultrapassa em geral um ano ¹². Sua persistência nos focos decorre do ritmo de reprodução que depende por sua vez de diversos fatores ecológicos intrínsecos que influenciam a fecundidade, a postura e a viabilidade dos ovos.

Os moluscos do gênero *Biomphalaria* são hermafroditas, mas observa-se tanto a autofecundação como a fecundação cruzada. A oviposição geralmente é noturna e os ovos apresentam-se envolvidos em cápsulas elástica, gelatinosa, resistente e transparente. Esta cápsula fica presa a um suporte, geralmente vegetação aquática, ou quaisquer superfícies sólidas submersas, inclusive a concha de outros caramujos. Cada cápsula ovígera libera em média de 20 a 100 ovos que dependendo da temperatura, demoram cerca de oito dias até eclodir o molusco ^{1, 12, 15}. Segundo Paraense¹, nas condições naturais existe preferência pela fecundação cruzada aumentando a variabilidade, enquanto a autofecundação só é utilizada em condições desfavoráveis, como por exemplo, em casos extremos onde populações são quase totalmente eliminadas sobrevivendo apenas um indivíduo. Neste caso a recolonização se dá através da autofecundação do único sobrevivente, efeito fundador, e desta maneira todas as características genéticas que formarão a estrutura genotípica da nova população estarão concentradas neste único indivíduo. Se este for portador de características hereditárias atípicas, estas poderão predominar na nova população. Este efeito fundador é uma explicação plausível para a alta variabilidade interpopulacional, a ponto de serem consideradas como espécies distintas, apesar de apresentarem baixa variabilidade intrapopulacional ^{1, 16-20}. A alta variabilidade interpopulacional ocorre devido ao baixo fluxo gênico entre as populações, o que faz com que elas se tornem bem diferentes umas das outras. A baixa variabilidade intrapopulacional deve-se talvez, às pressões ambientais que induzem a hibernação, a diapausa, a estivação ou o enterramento desses caramujos. No decorrer da formação da colônia a multiplicação dos descendentes ocorre por reprodução cruzada este fato explicaria a ocorrência de algumas colônias com características próprias e pequena variação individual¹. A figura 3 mostra um molusco do gênero *Biomphalaria*.



FIGURA 3: Molusco do gênero *Biomphalaria* com desova ²¹.

1.2.2 Suscetibilidade dos moluscos do gênero *Biomphalaria* ao *S. mansoni*

A suscetibilidade dos moluscos do gênero *Biomphalaria* ao *S. mansoni* pode variar entre áreas geográficas ²²⁻²⁴, populações na mesma área, indivíduos dentro de uma mesma população e moluscos de diferentes idades ²⁵⁻²⁷. Algumas espécies de *Biomphalaria* têm apresentado variado grau de suscetibilidade à infecção por *S. mansoni*; ^{11, 22-23, 28-29}.

A suscetibilidade dos moluscos planorbídeos à infecção por *S. mansoni* é característica controlada geneticamente e herdável ao longo das gerações ^{25, 30-33}. Segundo Lewis et al. ³⁴, as interações parasito-hospedeiro são influenciadas por genes do molusco que controlam a suscetibilidade e genes do parasito que determinam a infectividade. Em estudos prévios Zanotti-Magalhães et al. ³⁵ através do método de seleção genética utilizando o processo de autofecundação de progênie suscetíveis *B. glabrata* e *B. tenagophila*, paralelamente à passagem sucessiva do trematódeo em moluscos selecionados, mostraram crescentes taxas de infecção, evidenciando forte ajuste entre o trematódeo e os vetores. Boissier et al. ³⁶, utilizando o sistema *B. glabrata* - *S. mansoni* mostraram que a carga genética do hospedeiro intermediário *B. glabrata* pode influenciar na transmissão do parasita. Esta adaptação fisiológica entre o molusco e o parasito foi confirmada

experimentalmente por Zavodna et al. ³⁷, utilizando novamente o sistema *B. glabrata* - *S. mansoni*.

Das três espécies hospedeiras naturais no Brasil *B. glabrata* é a mais importante, devido à sua ampla distribuição, alta suscetibilidade à infecção pelo *S. mansoni*, tanto natural quanto experimental ²², e altos índices de compatibilidade ao *S. mansoni* ³⁸. *B. straminea* possui importância na região nordeste do Brasil, onde, em algumas áreas, é a principal responsável pela transmissão da doença ³⁹. Paraense e Corrêa ⁴⁰ ressaltam a forma lenta, mas constante, pela qual a esquistossomose vem se expandindo no Brasil, em todas as direções, principalmente nas regiões sudeste e sul, e chamam atenção para o papel importante de *B. tenagophila* como vetor biológico nessas regiões.

B. amazonica e *B. peregrina* nunca foram encontradas naturalmente infectadas com *S. mansoni*, porém essas espécies mostraram-se suscetíveis sobre condições experimentais. Exemplos de *B. amazonica* de Careiro da Várzea (AM) mostraram ser altamente suscetíveis à infecção com duas cepas de *S. mansoni* (BH e SJ) com uma taxa de infecção de 48% e 73% respectivamente ¹⁰. Estudo realizado utilizando *B. amazonica* de Porto Velho (RO) mostrou um baixo grau de compatibilidade entre a população estudada e a cepa utilizada (SJ) com taxa de infecção de 3,5% ²⁸. Fernandez e Thiengo ²⁹ confirmaram este resultado quando, utilizando *B. amazonica* de Mato Grosso com três cepas de *S. mansoni* (BH, SJ e EC) observaram taxa de infecção de 3,79%, 13,63%, 9,09% respectivamente.

Exemplos de *B. peregrina* de Lapa (PR) mostraram ser altamente suscetíveis à infecção com a cepa (BH) de *S. mansoni* apresentando taxa de infecção de 45% ¹¹. No mesmo artigo, exemplos de *B. peregrina* do Equador mostraram ser suscetíveis à infecção com duas cepas de *S. mansoni* (BH e SJ) com uma taxa de infecção de 33% e 15% respectivamente.

1.2.3 Identificação morfológica dos moluscos do gênero *Biomphalaria*

A correta identificação dos planorbídeos do gênero *Biomphalaria* permite conhecer a fauna de moluscos de uma determinada região e detectar espécies presentes em áreas de transmissão da esquistossomose, bem como em áreas indenes, mas que em função da presença de espécies suscetíveis podem vir a se

tornar focos da esquistossomose. O método de identificação utilizado rotineiramente nos levantamentos malacológicos é o morfológico, devido ao baixo custo financeiro.

A identificação morfológica do gênero *Biomphalaria* baseia-se na comparação dos caracteres da concha, dos sistemas excretor e reprodutor feminino - masculino ^{4, 8, 41-48}. Entre os aspectos relacionados ao diagnóstico específico dos planorbídeos um dos mais importantes é a habilidade e especialização do investigador em dissecar os moluscos e caracterizar as espécies em função das diferenças morfológicas ^{8, 45-47}. Entretanto, esta identificação às vezes é dificultada pela variação observada nos caracteres utilizados na identificação clássica e nos órgãos dotados de tecido muscular, devido ao seu estado de distensão no momento da fixação ⁸. A identificação morfológica também pode ser dificultada pelo pequeno tamanho de alguns exemplares de difícil dissecção e cujos caracteres morfológicos distintivos não são muito evidentes. Além disso, alguns planorbídeos como *B. straminea*, *B. kuhniana* e *B. intermedia* possuem diferenças morfológicas no aparelho reprodutor pouco características, dificultando a separação destas espécies. Diante da semelhança morfológica entre estas três espécies Paraense ⁴⁷, propôs o seu agrupamento no complexo *B. straminea*. Este autor menciona que a separação de *B. kuhniana* e *B. straminea* não é fácil, sendo necessário o exame de um grande número de exemplares de ambas as espécies. Outros planorbídeos como *B. tenagophila*, *B. t. guaibensis* e *B. occidentalis* também possuem dificuldades na sua correta identificação. Spatz et al. ⁴⁹ agrupou essas espécies no complexo *B. tenagophila*. O mesmo autor também reporta que *B. t. guaibensis* parece estar relacionada mais proximamente com *B. occidentalis* ao invés de *B. tenagophila*, dado observado posteriormente por Vidigal et al. ⁵ em estudo das relações filogenéticas dos moluscos brasileiros do gênero *Biomphalaria*.

Paraense ⁵⁰ ressalta que em virtude de algumas espécies ocuparem ambientes diversificados elas apresentam uma grande variação morfológica interespecífica. Em relação às conchas, sabe-se que essas sofrem a ação do ambiente, estando também sujeitas a variações principalmente na coloração ⁵¹. Estas questões ilustram a importância da sistemática para o conhecimento desses planorbídeos e demonstram como os caracteres morfológicos relacionam as espécies entre si. Monis ⁵² enfatiza a importância da sistemática nas pesquisas em parasitologia como base de toda a biologia comparativa.

O alvo desta dissertação é a verificação da presença de *B. cousini* no Brasil. Em virtude de sua semelhança morfológica com *B. amazonica*, será detalhada a seguir as características dessas duas espécies.

1.2.3.1 Identificação morfológica de *Biomphalaria amazonica*

B. amazonica foi descrita por Paraense ⁴ em referência a sua localidade tipo: Igarapé da Cachoeirinha, Manaus, Amazonas. Curiosamente, nesta mesma publicação foi descrita outra espécie para as Américas, *B. cousini* (localidade tipo Santo Domingo de los Colorados de Pichincha, Equador) morfológicamente semelhante à *B. amazonica*.

Conforme a descrição de Paraense ⁴ *B. amazonica* possui concha com tamanho máximo de 8 mm de diâmetro e 2,5 mm de largura. Possui cinco giros acentuadamente convexos nos dois lados, crescendo rapidamente em diâmetro e visíveis em ambos os lados, o central mais completamente a esquerda. O lado direito da concha é moderadamente côncavo enquanto o esquerdo é moderadamente plano. Apresenta sutura bem marcada em ambos os lados e abertura ovóide ou arredondada, freqüentemente defletida para a esquerda (Figura 4).

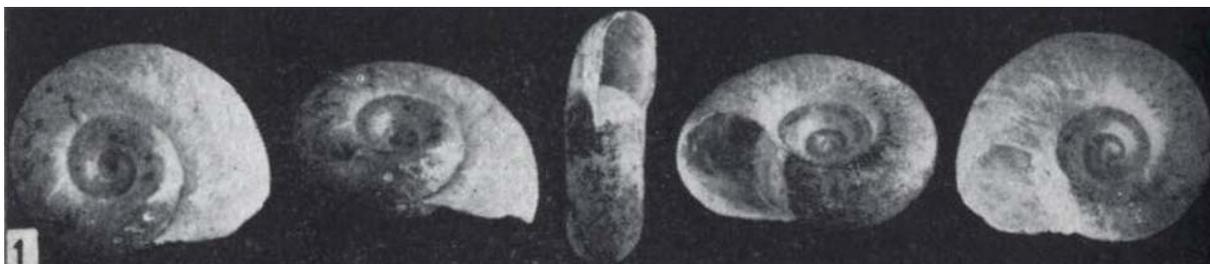


FIGURA 4: Concha de *B. amazonica* aumento 4x ⁴.

A mandíbula é em formato de T como em outras espécies de *Biomphalaria*. Existem 105 a 111 fileiras de dentes com 4 a 5 laterais 2 a 3 intermediários e 13 a 19 marginais. O manto possui manchas largas e escuras do lado direito e no teto da cavidade pulmonar onde elas tendem a se agrupar, e se tornam menores, mais claras e mais esparsas do lado esquerdo. A superfície ventral do tubo renal é lisa, sem crista e sem pigmentação. O ovoteste apresenta-se com 30 a 50 divertículos claviformes ou digitiformes, sendo quase todos lisos sem ramificações, arranjados em linhas transversais na porção cefálica e um após o outro na porção caudal. O oviduto é fino e ligeiramente enrugado na superfície. Sua porção cefálica final é expandida formando uma bolsa lisa. A vagina possui uma curta porção cilíndrica entre sua saída e a inserção do ducto da espermateca. A parede ventral da vagina é

expandida em bolsa bem delimitada, a espermateca é claviforme ou ovóide e tende a ser maior que a bainha do pênis e menor que o prepúcio. A parte do ducto feminino entre o meio da bolsa do oviduto e a saída da vagina é mais longa que o restante caudal do ducto que corresponde ao oviduto. Todo o ducto feminino, da saída da vagina até a encruzilhada genital é quase duas vezes mais longo que o complexo peniano. A próstata apresenta de 8 a 12 divertículos ordenados em fileiras, relativamente curtos e largos pouco ramificados. Seus ramos estendem um pouco lateralmente, e um mal sobrepõe o outro. A metade distal do vaso deferente é mais larga que a metade proximal, a bainha do pênis é aproximadamente mais curta que o prepúcio sendo sua porção média (bainha do pênis) aproximadamente do mesmo diâmetro que a porção mais larga do canal deferente. Inserção de apenas um músculo retrator principal na junção entre a bainha do pênis e o prepúcio e inserção dos músculos retratores acessórios na parede do prepúcio (Figura 5).

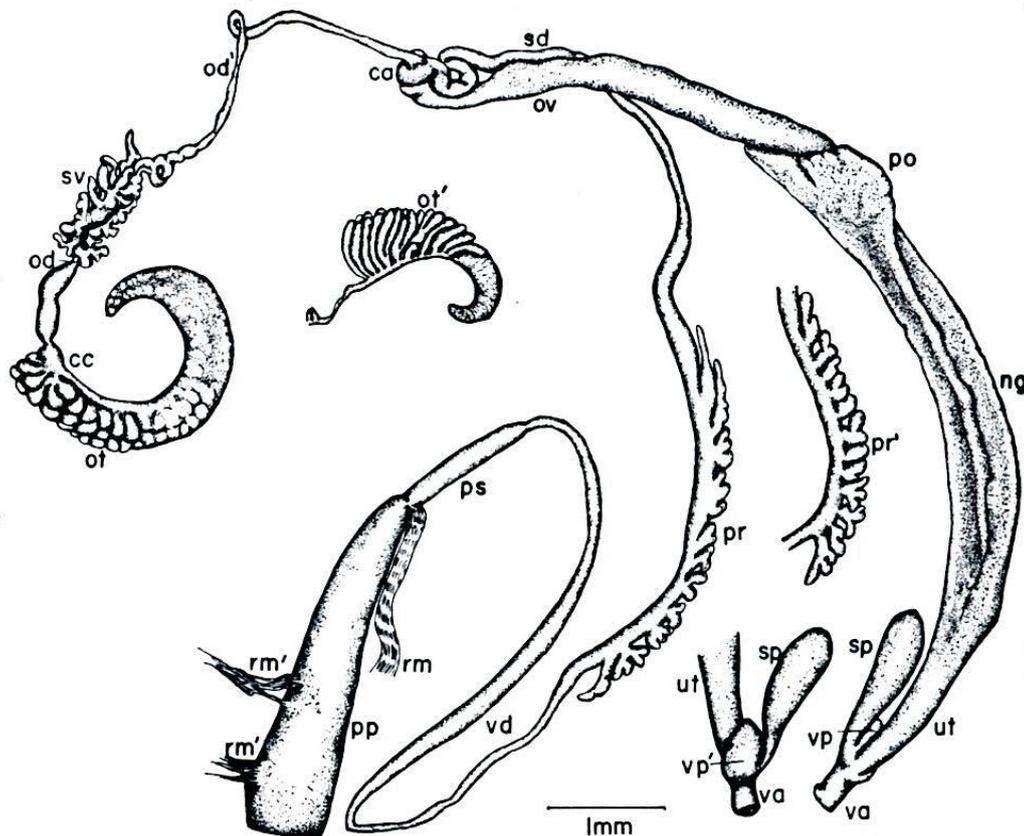


FIGURA 5: Sistema genital de *B. amazonica*. **Legenda:** ca: carrefour, cc: canal coletor do ovoteste, ng: glândula nidamental, od: segmento proximal do ovispermiduto, od': segmento distal do ovispermiduto, ot: ovoteste, ot': ovoteste de espécime jovem, ov: oviduto, po: bolsa do oviduto, pp: prepúcio, pr: próstata, pr': próstata de outro espécime, ps: bainha do pênis, rm: principal músculo retrator do complexo peniano, rm': músculos retratores acessórios do complexo peniano, sd: espermiduto, sp: espermateca, sv: vesícula seminal, ut: útero, va: vagina, vd: vaso deferente, vp: bolsa vaginal, vp': bolsa vaginal vista pelo lado ventral ⁴.

B. amazonica foi reportada para o Brasil nos Estados do Amazonas⁴, Acre, Rondônia⁵³, Mato Grosso²⁸ e Mato Grosso do Sul⁵⁴; Bolívia⁵⁵ e Colômbia⁵⁶.

Esta espécie nunca foi encontrada naturalmente infectada com *S. mansoni*, porém mostrou-se suscetível em condições experimentais podendo ser considerada um hospedeiro em potencial do parasito^{10, 28-29}.

1.2.3.2 Identificação morfológica de *Biomphalaria cousini*

B. cousini foi descrita por Paraense⁴ e sua localidade tipo é Santo Domingo de los Colorados de Pichincha, Equador.

Segundo a descrição de Paraense⁴ *B. cousini* possui concha com tamanho máximo de 7,6 mm de diâmetro e 2,9 mm de largura. Possui 4 a 5 cinco giros arredondados nos dois lados, crescendo rapidamente em diâmetro. Do lado esquerdo os giros são amplamente côncavos com suturas profundas e são mais planos do que os do lado direito que apresentam o giro mais interno delimitado por uma profunda sutura, e os demais giros são delimitados por estreitas suturas. A abertura é ovóide ou arredondada, freqüentemente defletida para a esquerda (Figura 6).

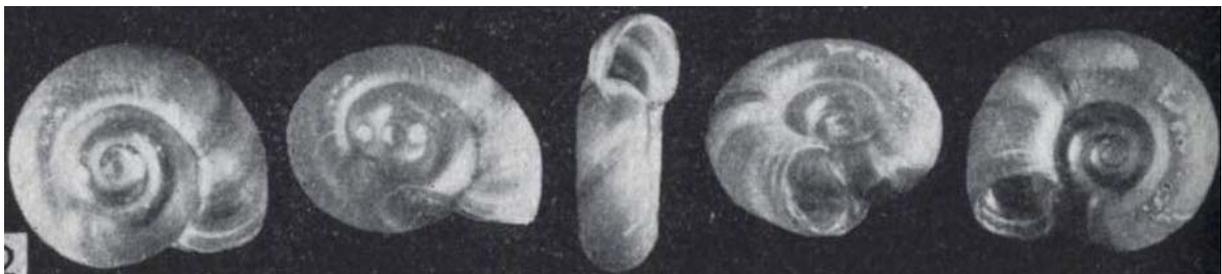


FIGURA 6: Concha de *B.cousini* aumento 4x⁴.

A mandíbula é em formato de T como em outras espécies de *Biomphalaria*. Existem 120 a 156 fileiras de dentes com 5 a 7 laterais 2 a 4 intermediários e 15 a 21 marginais. O Manto possui manchas largas e escuras do lado direito e no teto da cavidade pulmonar onde elas tendem a se agrupar, e se tornam menores, mais claras e mais esparsas do lado esquerdo. A superfície ventral do tubo renal é lisa, sem crista, e não apresenta pigmentação na porção caudal do tubo renal. O ovoteste apresenta-se com 15 a 25 divertículos claviformes, ovóides ou em forma de pêra arranjados em pares ou um após o outro, sem ramificação. O oviduto é fino e ligeiramente enrugado na superfície. O oviduto e a glândula nidamental são comparativamente mais largo que em *B. amazonica*. A vagina apresenta uma porção cefálica dilatada separada da região caudal mais ou menos demarcada por uma

constricção. A porção caudal mostra uma elevação plana indicando a presença de uma bolsa muito pouco delimitada. O comprimento da área elevada corresponde, aproximadamente, a metade do ducto da espermateca. Em alguns exemplares não há elevação perceptível. A espermateca é claviforme e tende a ser maior que a bainha do pênis e quase do mesmo tamanho do prepúcio. Todo o ducto feminino, da saída da vagina até a encruzilhada genital é duas vezes e meia mais longa que o complexo peniano. A próstata apresenta de 5 a 10 divertículos ordenados em fileiras, apresentando ramificações e espaços entre eles. O último, e as vezes o penúltimo divertículo, são muito maiores que os restantes e pode alcançar o mesmo comprimento que toda a próstata medida entre a base do primeiro e do último divertículo. A metade distal do vaso deferente é aproximadamente da mesma largura que a metade proximal. A bainha do pênis é aproximadamente mais curta que o prepúcio sendo sua porção média (bainha do pênis) com diâmetro maior do que a porção mais larga do canal deferente. Inserção de dois músculos retratores principais na junção entre a bainha do pênis e o prepúcio e inserção dos músculos retratores acessórios na parede do prepúcio (Figura 7).

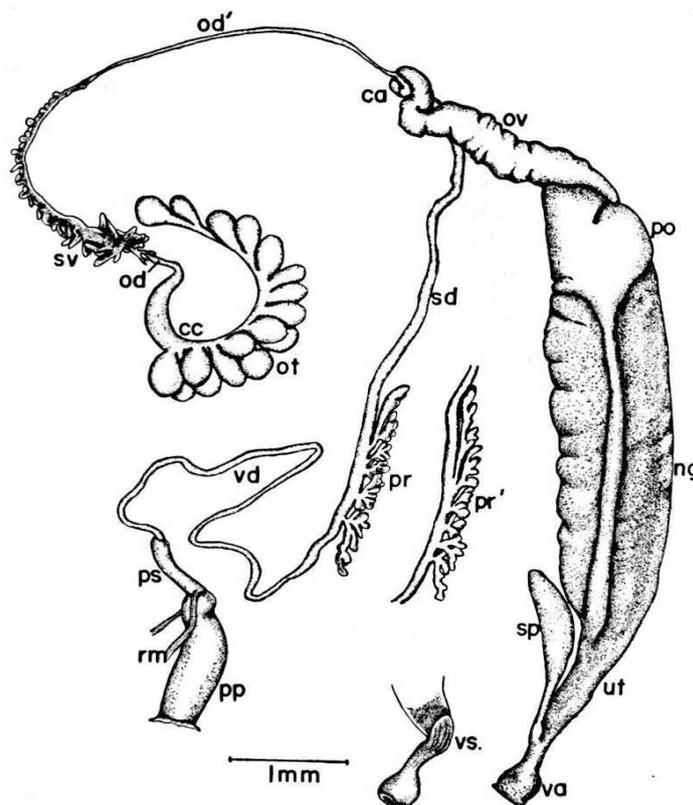


FIGURA 7: Sistema genital de *B. cousini*. **Legenda:** vs: porção cefálica dilatada da vagina ⁴. As demais legendas estão apresentadas na figura 4.

B. cousini foi reportada até o momento apenas para o Equador ⁴ e não possui nenhum relato quanto à suscetibilidade ao *S. mansoni*.

1.2.3.3 Distinção morfológica de *B. amazonica* e *B. cousini*

A tabela 2 apresenta as principais diferenças morfológicas que distinguem *B. amazonica* e *B. cousini* segundo Paraense⁴.

Tabela 2: Caracteres diagnósticos que distinguem *B. amazonica* de *B. cousini*

Caracteres diagnósticos	<i>B. amazonica</i>	<i>B. cousini</i>
Forma da vagina	cilíndrica	bulbosa e constricta
Presença de bolsa vaginal	presente e bem desenvolvida	mera elevação fortemente delimitada ao redor da superfície
Forma dos divertículos prostáticos	curtos e pouco subdivididos em ramos	longos, numerosos e mais subdivididos em ramos
Diâmetro da metade distal do vaso deferente	muito mais largo que a metade proximal e quase tão largo quanto a bainha do pênis	quase tão largo quanto a metade proximal e mais estreito que a bainha do pênis
Divertículos do ovoteste (forma e quantidade)	Claviformes ou digitiformes e numerosos	Arredondados e bem menos numerosos

1.3 Biologia Molecular

Em decorrência de toda essa diversidade morfológica e biológica, do gênero *Biomphalaria*, técnicas alternativas foram introduzidas no intuito de auxiliar a morfologia para uma correta identificação das espécies desse gênero e melhor compreender a variabilidade genética entre esses moluscos. Um avanço marcante foi a introdução de métodos moleculares. A sistemática molecular pode abordar diversos problemas que antes eram considerados insolúveis pela metodologia tradicional⁵⁷. Monis⁵² reforça a importância dos métodos clássicos, entretanto sugere a utilização de ferramentas moleculares numa combinação dos métodos podendo produzir uma sistemática mais sólida.

A escolha da região alvo do DNA é um ponto importante a ser considerado para uma correta identificação das espécies. Nesta dissertação, duas regiões do DNA foram estudadas: parte da região 16S do gene do RNA ribossomal mitocondrial e a região espaçadora transcrita interna (ITS) do DNA ribossomal. A utilização de duas regiões distintas de DNA objetivou dar mais consistência aos dados apresentados.

1.3.1 Região espaçadora transcrita interna do rDNA

O gene codificador do RNA ribossomal está presente em diversas cópias no genoma dos eucariotos^{5, 58-61}. Este gene inclui repetições em *tandem* das regiões codificadoras que são as regiões 18S, 5.8S e 28S, separadas pelas regiões espaçadoras transcritas internas um e dois (ITS1 e ITS2)^{62, 63}.

O RNA ribossomal é um componente essencial na fisiologia celular. As regiões codificadoras (genes) interagem com proteínas específicas para formar as sub-unidades dos ribossomos que atuam na síntese protéica. Em virtude dessa função vital, essas sequências são conservadas. Essa característica a torna atrativa para o estudo de relações filogenéticas nos grandes táxons⁶⁴⁻⁶⁶. Por outro lado, as regiões espaçadoras transcritas internas por não serem codificadoras (são transcritas, mas não traduzidas e auxiliam na formação de subunidades do rDNA), apresentam maiores probabilidades de mutação sendo portanto, mais variáveis. Essa característica é apropriada para estimar relações nos níveis taxonômicos inferiores como gêneros e espécies^{62, 67-68}. As variações nas regiões espaçadoras têm sido utilizadas para identificar espécies ou cepas, sendo um bom marcador em estudos de genética de populações⁶⁹⁻⁷¹. As regiões ITS1 e ITS2 vêm sendo utilizadas no estudo de vários organismos entre os quais, helmintos^{61, 72-73}, mamíferos⁷⁴, protozoários⁷⁵, *Anopheles*⁷⁶, fungos⁷⁷⁻⁷⁸, ácaros⁷⁹, plantas⁸⁰, e moluscos^{2, 5, 49, 81-86}.

1.3.2 Gene 16S do rDNA mitocondrial

O gene 16S é um dos 37 genes codificados pelo DNA mitocondrial. Os genes 12S e 16S codificam o RNA ribossomal mitocondrial. A região 12S codifica a subunidade menor e a 16S, a subunidade maior. A região 16S evolui mais lentamente que o DNA mitocondrial, provavelmente por atuar de forma crucial na síntese das proteínas mitocondriais, dessa maneira, suas sequências são ideais para estudos de diversidade interespecífica e para comparação de espécies próximas. Devido á sua ocorrência em todos os genomas mitocondriais e também pelo fato de possuir sequências e estruturas conservadas⁸⁷, o gene 16S tem sido bastante utilizado em análises filogenéticas de diversos grupos de animais^{6, 88-90}.

1.3.3 Taxonomia molecular dos moluscos brasileiros do gênero *Biomphalaria*

A taxonomia molecular não menospreza os dados morfológicos e tem sido utilizada como uma ferramenta auxiliar a morfologia quando esta não é suficiente para a identificação das espécies. Estudos que incorporam os dois tipos de análise podem gerar dados que permitem uma melhor compreensão e interpretação da diversidade biológica dos organismos.

Atualmente a taxonomia molecular dos moluscos brasileiros do gênero *Biomphalaria* é realizada através da técnica de PCR-RFLP (reação em cadeia da polimerase e polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição), utilizada por Saiki et al.⁹¹ no mesmo artigo em que descreveu a PCR. Esta técnica baseia-se na amplificação pela PCR de qualquer região do DNA e a subsequente digestão do fragmento amplificado com enzimas que cortam a fita dupla em sítios específicos de reconhecimento, denominados sítios de restrição.

Para a taxonomia molecular dos moluscos brasileiros do gênero *Biomphalaria* foi amplificada toda a região espaçadora transcrita interna (ITS) do rDNA. Os iniciadores anelam-se nas regiões conservadas da porção final da subunidade 18S e na inicial da 28S gerando um fragmento de aproximadamente 1200 pares de base, seguido de digestão com a enzima *DdeI*. Vidigal et al.² estabeleceram um diagrama com os perfis espécie-específicos das 10 espécies e uma subespécie do gênero *Biomphalaria* existentes no Brasil (figura 1).

1.4 Filogenia

A filogenia estuda a história, origem e evolução de cada grupo de organismos. O maior desafio para a sistemática é determinar a relação ancestral entre as espécies⁹². A sistemática clássica possibilita a síntese de uma grande quantidade de informação (tais como características de morfologia externa, embriologia, fisiologia e comportamento) em árvores evolutivas. A filogenia clássica foi uma tentativa de determinar a relação entre os organismos através de medidas de similaridade considerando plesiomorfias e apomorfias igualmente informativas. A maioria das classificações tem sido feita baseadas apenas na anatomia e ou morfologia, porém, muitas vezes esses caracteres são insuficientes e taxonomistas acabam classificando as espécies erroneamente. Por causa disto acredita-se que muitas espécies estejam em sinonímia. Nos últimos 250 anos a sistemática tem sido

influenciada pela hierarquia taxonômica de Linnaeus, na qual o nível de espécie é o principal entre todas as categorias⁹³.

De acordo com Mayr⁹⁴ espécies são grupos de populações que se cruzam e produzem descendentes férteis e que são isolados reprodutivamente de outros grupos. Esta premissa atualmente é conhecida como conceito biológico de espécie. Apesar de ser amplamente aceito, muitos organismos fogem a esta regra e por causa disto conceitos alternativos têm surgido⁹⁵, porém eles só começaram a ser aceitos após a década de 70 com o conceito fenético de espécies⁹⁶.

A diversidade dos conceitos de espécie é baseada, em parte, nas diferentes propriedades biológicas apresentadas pelos organismos e nas exceções presentes em cada conceito, por exemplo, o conceito biológico de espécies enfatiza o isolamento reprodutivo^{94,97}, o ecológico enfatiza a ocupação de diferentes nichos ou zonas adaptativas⁹⁸, o filogenético enfatiza a monofilia⁹⁹. Como consequência dessas diferenças, dependendo do conceito adotado, uma mesma espécie acaba sendo colocada em diferentes táxons.

A adoção de uma definição correta de espécie é ideal para o sucesso de uma pesquisa. Em moluscos do gênero *Biomphalaria* o conceito biológico é amplamente utilizado, uma vez que a dificuldade em se estabelecer a correta identificação dos exemplares baseados na morfologia tem levado ao uso de cruzamentos como ferramenta auxiliar nesta identificação dando ênfase no isolamento reprodutivo entre as espécies.

Paraense¹ padronizou, para moluscos do gênero *Biomphalaria*, a utilização do fator albinismo (determinado por um par de alelos recessivos) como marcador genético em estudos de cruzamento. Isto é, um indivíduo albino produz apenas indivíduos albinos por autofecundação enquanto a produção de indivíduos pigmentados na descendência de um albino corresponde a um heterozigoto, cuja pigmentação decorre da dominância do alelo normal, indicando ocorrência de fecundação cruzada. Paraense¹⁶ utilizou esta metodologia para verificar o valor taxonômico de um caractere morfológico, no caso a crista renal. Com os cruzamentos realizados, exemplares com e sem crista renal nunca produziram progênes híbridas. Baseando-se no conceito biológico de espécie, isto foi suficiente para considerar esses exemplares como espécies distintas. Da mesma maneira, Paraense e Deslandes¹⁰⁰ utilizaram esta metodologia para estudar planorbídeos do Estado de São Paulo. A identidade específica destes caramujos estava sujeita a muitas controvérsias e eles haviam sido classificados como cinco espécies

diferentes. Após os cruzamentos realizados verificou-se que todos eles eram apenas uma mesma espécie.

Outra ferramenta poderosa para estudar a relação entre as espécies é a filogenia molecular. Sendo uma das áreas da evolução molecular que gerou mais interesse nas últimas décadas, principalmente porque a análise filogenética por outros caminhos é muitas vezes de difícil acesso ¹⁰¹. Para estudos de reconstrução filogenética nenhuma outra técnica molecular, até o momento, é mais informativa que o sequenciamento nucleotídico. Em princípio, o uso de dados de sequências como caracteres para estudos filogenéticos é considerado muito simples ¹⁰². Segundo Swofford et al. ¹⁰², Pereira et al. ¹⁰³ e Scheneider ¹⁰⁴ os métodos de construção de árvores filogenéticas podem ser baseados em matrizes de distâncias ou em análises de estado de caráter. No primeiro caso estão os métodos de agrupamento de pares não ponderados, baseados na média aritmética (*Unweighted pair group method with arithmetic means* -UPGMA) e agrupamento de vizinhos (NJ-*neighbor joining*). No segundo caso estão os métodos da máxima parcimônia (MP-*maximum parsimony*); da máxima verossimilhança (ML-*maximum likelihood*) e da inferência Bayesiana (IB-*bayesian inference*).

Será detalhado os conceitos dos métodos de inferência filogenética NJ, MP e ML por terem sido utilizados nesta dissertação.

O agrupamento de vizinhos (NJ) foi desenvolvido por Saitou e Nei ¹⁰⁵ e é baseado no princípio da evolução mínima no qual através de algoritmos para calcular a distância genética entre os ramos encontra-se a árvore com a menor soma total de ramos ¹⁰⁶. Este método remove a premissa que os dados sejam ultramétricos, ou seja, não assume que todos os caracteres evoluem de um ancestral comum a uma mesma taxa.

O método da máxima parcimônia (MP) é baseado na suposição de que a árvore mais provável é que requer o menor número de mudanças para explicar toda a variação observada na matriz de caracteres. Esse método utiliza o princípio da homologia, ou seja, se dois táxons compartilham uma característica é porque essa foi herdada do último ancestral comum a ambos. Ainda que a evolução possa não ser sempre estritamente parcimoniosa, o método assume que o critério da parcimônia determina o maior número de acertos da árvore verdadeira quando se minimiza o número de passos evolutivos aceitos na árvore ¹⁰⁴.

O princípio básico da máxima verossimilhança (ML) consiste em estimar a probabilidade, com base em um determinado modelo, de um conjunto de dados

estar representando um processo que realmente ocorreu. O algoritmo da ML para construção de árvores filogenéticas foi desenvolvido por Felsenstein¹⁰⁷. Em termos de evolução de sequências de DNA, o método calcula a probabilidade de que aquelas sequências em estudo tenham sido geradas seguindo as premissas do modelo evolutivo escolhido. Nesse caso a topologia e o comprimento dos ramos de uma árvore são os parâmetros a serem estimados, dadas as sequências finais nas extremidades dos ramos. A probabilidade deve ser calculada para todas as topologias possíveis variando o tamanho dos ramos para um grupo de unidades taxonômicas operacionais (OTU) (espécies, gêneros, populações, genes ou qualquer outra unidade evolutiva). A árvore que apresentar a maior verossimilhança (probabilidade) é considerada a melhor estimativa da filogenia.

Além dos métodos de inferência filogenética, outra característica importante em sistemática filogenética são os grupos externos de comparação. A seleção dos grupos externos pode influenciar no comprimento e na ordem dos ramos e nas taxas de divergências¹⁰⁸⁻¹¹⁰. Os grupos externos são capazes de dar o sentido do tempo na análise de um grupo, o que acaba provendo a raiz da árvore filogenética que corresponde ao ancestral comum mais recente de todos os membros do grupo interno¹¹¹. A escolha de um *outgroup* inadequado pode gerar erros na análise se este for muito distante do grupo em estudo. Esta escolha deve ser criteriosa, de modo a minimizar o impacto de longos ramos nas árvores, que podem alterar a relação entre os táxons. Após a construção das árvores é importante conhecer o grau de confiabilidade dos ramos reconstruídos. Um dos testes mais utilizados é o *bootstrap*¹¹². A base desse método consiste de uma simples reamostragem com reposição pseudoaleatória dos dados. Em cada reamostragem, o número total de dados amostrados mantém-se constante. Além disso, cada posição de nucleotídeo tem a mesma probabilidade de ser amostrada e, conseqüentemente, algumas serão contadas mais de uma vez enquanto outras não serão amostradas. A cada reamostragem uma árvore réplica é reconstruída. Essa técnica revela a consistência interna dos dados, ou seja, se a topologia muda muito conforme a reamostragem dos dados, o valor de “bootstrap” será menor e, portanto a árvore será menos confiável. Hillis e Bull¹¹³ através de estudos de simulação propuseram um valor de 70% de “bootstrap” como limiar de significância. Li¹⁰⁶ propôs um valor de “bootstrap” igual ou superior a 95% para que um agrupamento seja considerado como significativamente apoiado.

1.4.1 Inferências filogenéticas dos moluscos do gênero *Biomphalaria*

Alguns estudos foram realizados para inferir a filogenia dos moluscos do gênero *Biomphalaria* utilizando-se dados de sequência de DNA. Vidigal et al. ⁵ observaram uma variação intraespecífica em exemplares de *B. amazonica* a partir da análise de sequências utilizando a região ITS2 do rDNA das espécies brasileiras do gênero *Biomphalaria* (Figura 8).

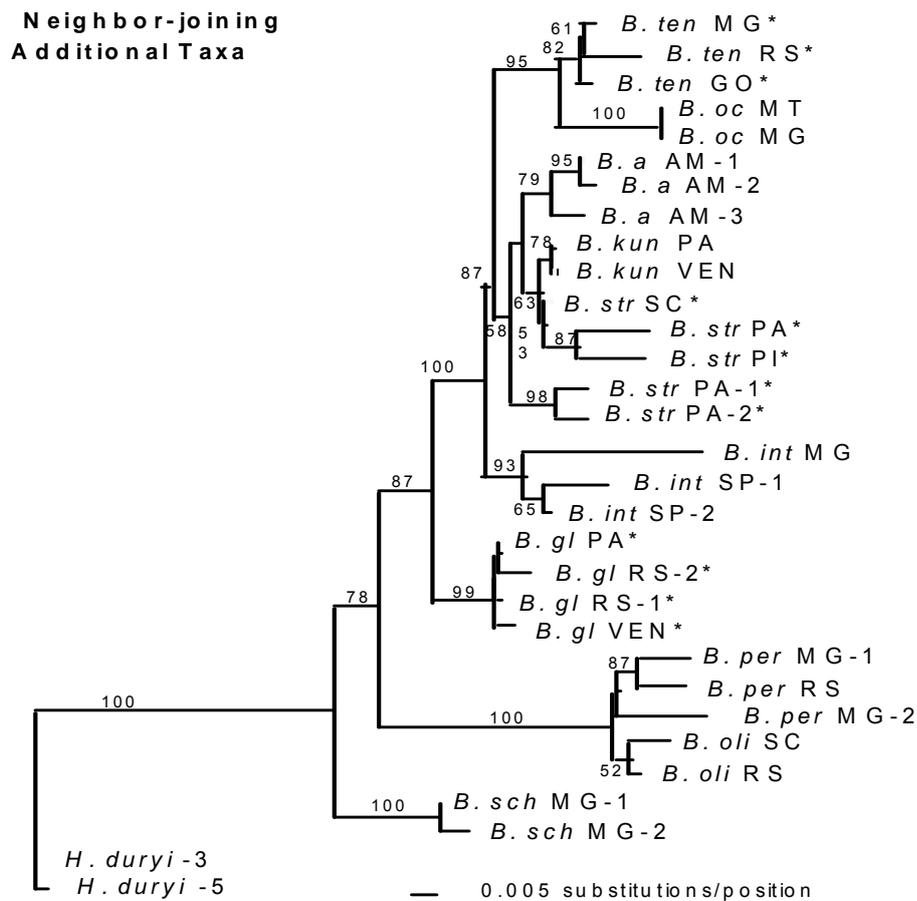


Figura 8: Árvore filogenética Neighbor-Joining de espécies do gênero *Biomphalaria* utilizando-se a região espaçadora transcrita interna dois (ITS2) do rDNA. Os * indicam as espécies hospedeiras naturais do *S. mansoni*. Valores de bootstrap maiores que 50% estão posicionados próximo de cada ramo ⁵.

Dejong et al. ⁶ confirmaram esta variação intraespecífica entre dois exemplares de *B. amazonica* do Brasil e um da Bolívia, usando sequências nucleotídicas combinadas das regiões ITS1, ITS2 do rDNA e parte da região 16S do rDNA mitocondrial de 16 espécies latino americanas e 7 africanas. (figura 9).

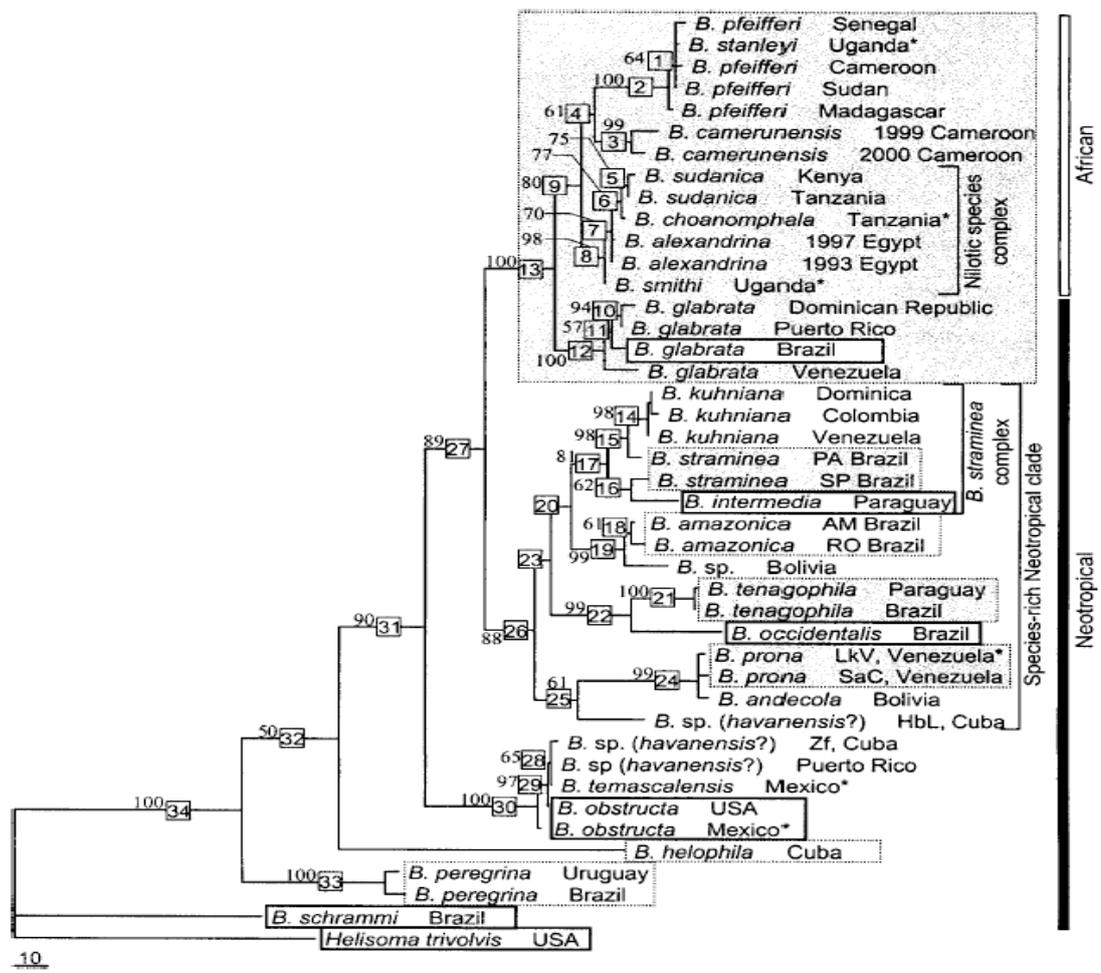


Figura 9: Uma das 234 árvores geradas de Máxima Parcimônia para espécies do gênero *Biomphalaria* utilizando dados combinados das regiões espaçadoras transcritas interna um e dois (ITS1 e ITS2) do rDNA e parte da região 16S do rDNA mitocondrial. Valores de bootstrap maiores que 50% estão posicionados próximo de cada ramo. Valores dentro dos quadrados mostram quantidade de nós presentes em mais de 50% de todas as árvores geradas ⁶.

Estrada et al. ⁷ enfatizaram esta variação intraespecífica entre dois exemplares de *B. amazonica* do Brasil e outro da Bolívia estudando as sequências nucleotídicas combinadas das regiões ITS1 e ITS2 de 14 espécies latino americanas (Figura 10).

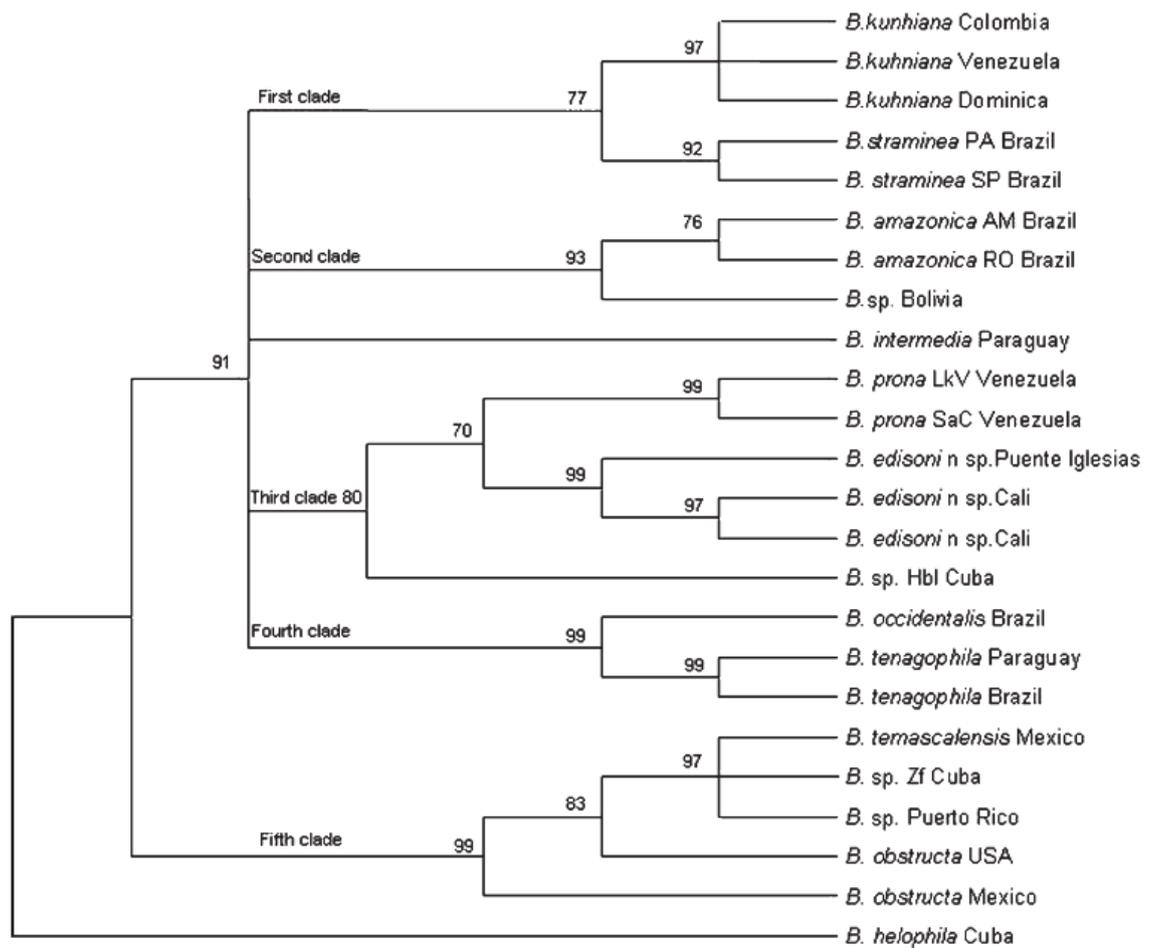


Figura 10: Arvore consenso de Máxima Parcimônia para espécies do gênero *Biomphalaria* utilizando dados combinados das regiões ITS1 e ITS2 do rDNA . Valores de bootstrap maiores que 50% estão posicionados próximo de cada ramo ⁷.

Estas análises de reconstrução filogenética indicam que existe variação entre as populações denominadas *B. amazonica* e novos estudos são necessários para o entendimento desta variabilidade.

2.1 Objetivo geral

Investigar a ocorrência de *B. cousini* no Brasil e sua suscetibilidade ao *Schistosoma mansoni*.

2.2 Objetivos específicos

-  Identificar morfologicamente populações de *Biomphalaria* previamente identificadas como *B. amazonica* oriundas dos Estados do Amazonas e Mato Grosso (Brasil), Leticia (Colômbia) e Santa Cruz (Bolívia);
-  Obter o perfil espécie-específico das populações acima através da PCR-RFLP direcionada para a região ITS do rDNA com a endonuclease *Ddel*;
-  Comparar as sequências das mesmas populações citadas e compará-las com as sequências de outras espécies de *Biomphalaria* depositadas no Genbank através do sequenciamento dos nucleotídeos das regiões ITS2 do rDNA e parte da região 16S do rDNA mitocondrial;
-  Inferir a relação filogenética dessas populações com as demais espécies do gênero;
-  Confirmar a presença de exemplares híbridos utilizando cruzamentos entre população de *B. amazonica* albina e *B. cousini* pigmentada;
-  Verificar o potencial de suscetibilidade de *B. cousini* através do desafio com miracídios de *S. mansoni*;

3.1 Identificação morfológica

3.1.1 Amostras

Foram utilizados 33 exemplares de moluscos previamente identificados como *B. amazonica* e indicados na tabela abaixo. Estes moluscos pertencem ao acervo Laboratório de Helminologia e Malacologia Médica (LHMM) do CPqRR.

Tabela 3: Amostras utilizadas na identificação morfológica

Amostra	Origem geográfica	Número de amostras
População previamente identificada como <i>B. amazonica</i>	Santa Cruz, Bolívia	7
População previamente identificada como <i>B. amazonica</i>	Letícia, Colômbia	8
População previamente identificada como <i>B. amazonica</i>	Barão de Melgaço, Mato Grosso, Brasil	5
População previamente identificada como <i>B. amazonica</i>	Careiro do Castanho, Amazonas, Brasil	7
População previamente identificada como <i>B. amazonica</i>	Benjamin Constant, Amazonas, Brasil	6

3.1.2 Metodologia

Os 33 exemplares utilizados foram dissecados e identificados morfológicamente segundo Paraense^{4,8,46,47}.

3.2 PCR-RFLP

3.2.1 Amostras

Foram utilizados 33 exemplares de moluscos previamente identificados como *B. amazonica* e indicados na tabela 3.

3.2.2 Metodologia

3.2.2.1 Extração de DNA

O DNA de alguns dos exemplares encontrava-se armazenado à -20° C no LHMM. O DNA das demais populações foi extraído com auxílio do “Kit Wizard” (Promega) a partir do fragmento da região cefalopodal do molusco. Inicialmente, foram adicionados 200µl de solução de lise nuclear com 1µl de proteinase K

(20µg/ml) ao fragmento de tecido, que foi incubado a 37°C por 16 horas. Posteriormente, foram adicionados 80µl de solução de precipitação proteica®. A suspensão foi agitada vigorosamente com auxílio do vortex por 20 segundos e em seguida centrifugada a 13.000 RPM por 3 minutos. O sobrenadante foi transferido para um tubo contendo 200µl de isopropanol, homogeneizado por inversão durante 20 minutos e centrifugado a 13.000 RPM por 6 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensionado com 500µl de etanol absoluto juntamente com 10µl de acetato de sódio 3M ph 5.2 por 2 horas a -70 °C. Após este período o DNA foi lavado com 500µl de etanol 70% e centrifugado a 13.000 RPM por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” foi reidratado com 25µl de solução de re-hidratação® por 30 minutos a 37°C e armazenado a -20°C.

3.2.2.2 PCR específico direcionado para a região ITS- rDNA

A amplificação da região espaçadora transcrita interna do DNA ribossomal (ITS-rDNA) foi realizada utilizando os iniciadores ETTS1 (5'-TGCTTAAGTTCAGCGGGT-3') e ETTS2 (5'-TAACAAGGTTTCCGTAGGTGAA-3')¹¹⁴, homólogos às extremidades conservadas das subunidades 28S e 18S do gene do rRNA (Figura 11).

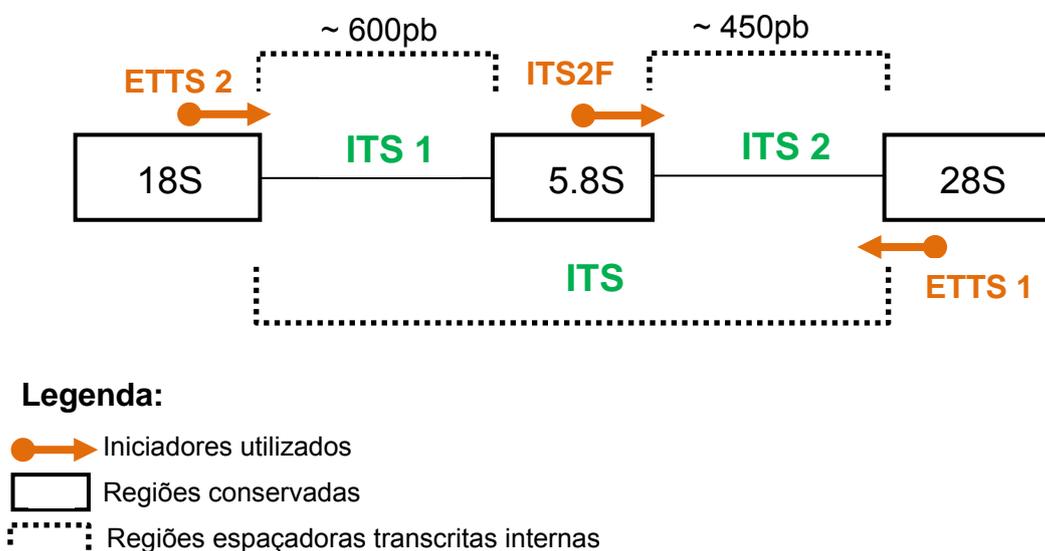


FIGURA 11: Região espaçadora transcrita interna do rDNA e os iniciadores utilizados.

A PCR, com um volume total de 10 µl, consistiu de 1-10 ng de DNA alvo, tampão (50 mM KCl, 10mM Tris-HCl, pH 8,5), 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,5 U de Taq-DNA polimerase (DNA polimerase termoestável da bactéria

Thermus aquaticus) e 5,0 pmoles de cada iniciador. A reação foi coberta com uma gota de óleo mineral para evitar a evaporação e submetida aos ciclos de amplificação onde a desnaturação inicial foi feita por 3 minutos a 95°C, seguida de 32 ciclos: anelamento a 54°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 2 min e desnaturação a 95°C por 45 segundos; e uma extensão final a 72°C por 5 minutos.

Todos os experimentos foram acrescidos de um controle negativo, sem adição de DNA. Três microlitros do produto de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 6% e corados pela prata para observação do perfil dos produtos de PCR.

3.2.2.3 RFLP

Os produtos de PCR direcionados para a região ITS foram diluídos em água, divididos em alíquotas de 10 µl e então digeridos separadamente com a endonuclease *Ddel* (Promega). A reação de digestão com volume total de 11,3µl consistiu de 0,3µl (10 a 12U) da enzima, 1 µl do respectivo tampão da enzima e 10µl do produto amplificado diluído. A digestão foi realizada a 37°C por 3 horas e 30 minutos seguida de 80°C por 20 minutos para desnaturação da enzima. Os produtos da digestão foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 6% e corados pela prata para observação dos perfis de restrição obtidos.

3.3 Sequenciamento e Filogenia

3.3.1 Amostras

Foram utilizados 69 exemplares de moluscos, sendo que de cada um foram obtidas seqüências nucleotídicas das regiões ITS2 rDNA e 16S rDNAm, totalizando 138 seqüências. Dessas, 69 foram geradas nesta dissertação e 69 obtidas do banco de dados Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). As sequencias das duas regiões foram analisadas combinadamente conforme descrito no item 3.3.2 desta dissertação totalizando 69 sequencias. A tabela 4 relaciona os exemplares utilizados nesta etapa, sua origem geográfica, quantidade de amostra, número de acesso de Genbank e sua codificação nas árvores filogenéticas.

Tabela 4: Amostras utilizadas nos estudos de filogenia

Amostra	Origem geográfica	Número de amostras	Número de acesso		Códigos utilizados nas árvores filogenéticas
			16S	ITS2	
População previamente identificada como <i>B. amazonica</i>	Santa Cruz, Bolívia	7	Sequenciado nesta dissertação	Sequenciado nesta dissertação	5838 a 5844_SCrBO
População previamente identificada como <i>B. amazonica</i>	Leticia, Colômbia	8	Sequenciado nesta dissertação	Sequenciado nesta dissertação	5501_LetCO 5503_LetCO 5506 a 5510_LetCO 5515_LetCO
População previamente identificada como <i>B. amazonica</i>	Barão de Melgaço, Mato Grosso, Brasil	5	Sequenciado nesta dissertação	Sequenciado nesta dissertação	3960 a 3963_BarMe 3965_BarMe
População previamente identificada como <i>B. amazonica</i>	Careiro do Castanho Amazonas, Brasil	7	Sequenciado nesta dissertação	Sequenciado nesta dissertação	4115_CarCa 4117 a 4119_CarCa 4262_CarCa 4265 a 4266_CarCa
População previamente identificada como <i>B. amazonica</i>	Benjamin Constant Amazonas, Brasil	6	Sequenciado nesta dissertação	Sequenciado nesta dissertação	3955 a 3959_BenCO 3128_BenCO
<i>B. amazonica</i>	Porto Velho Rondônia, Brasil	1	AY030217	AY030385	BamazoAM_1
	Benjamin Constant Amazonas, Brasil	1	AY030216	AY030384	BamazoAM_2
<i>B. sudanica</i>	Karungu, Kenya	1	AY030200	AY030368	BsudanAF_2
	Lago Victoria, Mwanza, Tanzania	1	AY030201	AY030369	BsudanAF_1
<i>B. pfeifferi</i>	Yaounde, Cameroon	1	AY030194	AY030362	BpfeffAF_2
	Mahazoa, Madagascar	1	AY030196	AY030364	BpfeffAF_1
<i>B. camerunensis</i>	Sangmelima, Cameroon	1	AY030198	AY030366	BcamerAF_2
	Yaounde, Cameroon	1	AY030199	AY030367	BcamerAF_1
<i>B. alexandrina</i>	Gyza, Egito	2	AY030203	AY030371	BalexAF_1
			AY030204	AY030372	BalexAF_2
<i>B. glabrata</i>	Jarabacoa, República Dominicana	1	AY030206	AY030374	BglabrAM_2
	Salvador, Bahia, Brasil	1	AY030208	AY030376	BglabrAM_1
<i>B. tenagophila</i>	Assunção, Paraguai	1	AY030219	AY030387	BtenagAM_2
	Formosa, Goiás, Brasil	1	AY030220	AY030388	BtenagAM_1
<i>B. peregrina</i>	San Antonio, Uruguai	1	AY030231	AY030400	BperegAM_2
	Nova Lima, Minas Gerais Brasil	1	AY030232	AY030401	BperegAM_1
<i>B. obstructa</i>	Mckinney Falls, Texas, USA	1	AY030228	AY030397	BobstrAM_2

	Ilha del Carmen, México	1	AY030229	AY030398	BobstrAM_1
<i>B. prona</i>	Lago Valência, Venezuela	1	AY030222	AY030390	BpronaAM_2
	Santa Cruz de Aragua, Venezuela	1	AY030223	AY030391	BpronaAM_1
<i>B. straminea</i>	Belém, Pará, Brasil	1	AY030213	AY030381	BstramAM_2
	São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil	1	AY030214	AY030382	BstramAM_1
<i>B. kuhniiana</i>	Roseau, Dominica	1	AY030210	AY030378	BkuhniAM_2
	Aragua, Venezuela	1	AY030212	AY030380	BkuhniAM_1
<i>B. smithi</i>	Lago Edward, Uganda	1	AY030205	AY030373	BsmithAF_1
<i>B. oligoza</i>	São Gabriel- Rio Grande do Sul- Brasil	1	Sequenciado nesta dissertação	-----	BoligoAM_1
	Florianópolis, Santa Catarina, Brasil	1	-----	AF198679	
<i>B. t. guaibensis</i>	Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil	1	Sequenciado nesta dissertação	-----	BtguaiAM_1
	Guaíba, Rio Grande do Sul, Brasil	1	-----	AY425750	
<i>B. edisoni</i>	Cali, Colômbia	1	Sequenciado nesta dissertação	AY364452	BedisoAM_1
<i>B. stanleyi</i>	Lago Albert, Uganda	1	AY030197	AY030365	BstanIAF_1
<i>B. choanomphala</i>	Lago Victoria, Mwanza, Tanzania	1	AY030202	AY030370	BchoanAF_1
<i>B. schrammi</i>	Minas Gerais, Brasil	1	AY030233	AY030402	BschraAM_1
<i>B. helophila</i>	Zapata, Cuba	1	AY030230	AY030399	BhelopAM_1
<i>B. temascalensis</i>	Temascal, Oaxaca, México	1	AY030227	AY030396	BtemasAM_1
<i>B. occidentalis</i>	Caceres, Mato Grosso, Brasil	1	AY030221	AY030389	BoccidAM_1
<i>B. intermedia</i>	Lago Itaipu, Limoy, Paraguai	1	AY030215	AY030383	BinterAM_1
<i>Helisoma trivolvis</i>	Pennsylvania, USA	1	AY030234	AY030403	Htrivolvis

3.3.2 Metodologia

3.3.2.1 Amplificação do DNA

A amplificação da região espaçadora transcrita interna do gene do RNA ribossomal (ITS2-rDNA) foi realizada utilizando os iniciadores ETTS1 (5'-TGCTTAAGTTCAGCGGGT-3')¹¹⁴ e ITS2F (5'-CGTCCGTCTGAGGGTCGGTTTGC-3')⁵, homólogos às extremidades conservadas das subunidades 28S e 5.8S do rDNA (Figura 11). A PCR, com um volume total de 10 µl, consistiu de 1-10 ng de DNA alvo, tampão (50 mM KCl, 10mM Tris-HCl, pH 8,5), 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,5 U de Taq-DNA polimerase (DNA polimerase termoestável da bactéria *Thermus aquaticus*) e 5,0 pmoles de cada iniciador. A reação foi coberta com uma gota de óleo mineral para evitar a evaporação e submetida aos seguintes ciclos de amplificação: desnaturação inicial por 3 minutos a 95°C, seguida de 32 ciclos de anelamento a 60°C por 1 minuto; extensão a 72°C por 2 min e desnaturação a 95°C por 45 segundos; e uma extensão final a 72°C por 5 minutos.

A amplificação de parte da região 16S do rDNA mitocondrial foi realizada utilizando os iniciadores: 16SMIT1 (5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3') e 16SMIT2 (forward 5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3')¹¹⁵. A PCR, com um volume total de 10µl, consistiu de 1-10 ng de DNA, tampão (50mM KCl, 10mM Tris-HCl, pH 8,5), 1,5 mM MgCl₂, 200 µm cada dNTP, 0.5 U de *Taq* DNA polymerase, 5,0 pmol de cada iniciador. A reação foi coberta com uma gota de óleo mineral para evitar a evaporação e submetido ao seguinte programa: um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 3 min, anelamento a 50°C por 2 min e extensão a 72°C por 1,5 min; 4 vezes o ciclo 93°C por 15 s, 50°C por 15 s, 72°C por 1,5 min; 24 vezes o ciclo 93°C por 5 s, 50°C por 8 s, 72°C por 1 min 1 ciclo de 93°C por 15 s, 50°C por 1 min e uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

Todos os experimentos foram acrescidos de um controle negativo, sem adição de DNA. Três microlitros do produto de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% e corados por brometo de etídio para observação do perfil dos produtos de PCR.

3.3.2.2 Purificação do produto da PCR

Após a eletroforese em gel do produto da PCR, os iniciadores e nucleotídeos foram removidos utilizando a enzima EXO/SAP (USB Corporation) conforme protocolo do fabricante. Foi utilizado 3µl da enzima juntamente com os 7µl

restantes do produto da PCR. A reação foi mantida a 37°C por 45 min seguidos por 15 min a 80°C. O produto purificado foi mantido a 4°C até a realização da reação de sequenciamento.

3.3.2.3 Reação de Sequenciamento

O sequenciamento das regiões ITS2-rDNA e parte da região 16S do rDNAmt foi feito em ambas as fitas, sendo a senso e anti-senso, obtidas dos produtos da PCR purificados anteriormente. A reação de sequenciamento foi realizada conforme descrito no protocolo do fabricante (Kit DYEnamic ET dye terminator MegaBace®, Amersham- UK limited, England). Nas reações de sequenciamento com volume final de 10µl foram utilizados 90ng de DNA, 5 pmoles de cada iniciador (já mencionados acima e variando de acordo com cada região que estava sendo sequenciada), e 4 µl do kit com dideoxynucleotídeos marcados com fluorocromos. A reação foi realizada de acordo com o seguinte programa: ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 25 seg, anelamento a 50°C por 15 seg e extensão a 60°C por 1 min; 30 vezes o ciclo 95°C por 25 seg, 50°C por 15 seg, 60°C por 1 min. Os produtos da reação de sequenciamento foram purificados por precipitação de acordo com o protocolo: a cada poço da placa de sequenciamento foi adicionado 1 µl de acetato de amônio® (Amersham- UK limited®, England) e 30 µl de etanol absoluto (Merck, Brasil). A placa foi agitada com auxílio do vortex rapidamente e incubada por 20 min a temperatura ambiente e protegida da luz. Em seguida a placa foi centrifugada a 3.700 RPM por 45 min a 20°C, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 100 µl de etanol 70%. A placa foi centrifugada a 3.700 RPM por 10 min a 20°C. Novamente o sobrenadante foi descartado e a placa foi centrifugada invertida sobre papel absorvente por 1 seg a 800 RPM. A placa foi incubada novamente por 15 min protegida da luz para a total evaporação do etanol. Em seguida as amostras foram ressuspensas em 10 µl de tampão de amostra® (Amersham- UK limited, England) e agitadas no vortex por 2 min. As placas foram colocadas no sequenciador automático MEGABACE 1000 DNA *Analysis System* (Amersham). De cada indivíduo e para cada região foram sequenciados no mínimo cinco seqüências senso e cinco anti-senso para garantir a confiabilidade da seqüência final.

3.3.2.4 Confirmação das sequências

A confirmação das sequências como sendo da região alvo foi feita por busca por similaridade utilizando-se os parâmetros padrão do programa BLAST (*Basic Local Alignment Tool*) disponível no sítio www.ncbi.nlm.nih.gov, comparando-as com sequências de moluscos depositadas no GenBank .

3.3.2.5 Análise das sequências

3.3.2.5.1 O programa Phred-Phrap-Consed

O programa Phred ¹¹⁶ que consiste na leitura binária dos cromatogramas gerados pelo sequenciador transformou-os em formato de texto e atribuiu um valor de qualidade para cada base lida. Foi considerado para o agrupamento das sequências o valor de qualidade de phred >20. O programa Phrap ¹¹⁷, responsável pela montagem dos fragmentos de DNA sequenciados em regiões, gerou uma sequência consenso com base na sobreposição de sequências. As sequências que não apresentaram homologia com nenhuma outra foram reunidas em um arquivo chamado de sequências únicas (*singlets*). O programa Consed ¹¹⁸ permitiu a visualização e edição das sequências geradas pelo Phrap.

3.3.2.5.2 Alinhamento das sequências

O alinhamento múltiplo das sequências consenso geradas, foi realizado utilizando o programa Muscle ¹¹⁹ que busca aperfeiçoar o alinhamento múltiplo pela pesquisa de um alinhamento que minimize globalmente as diferenças entre as sequências. Para garantir um alinhamento ótimo foi utilizado o programa trimAl ¹²⁰, uma ferramenta para trimagem automática de sequências.

3.3.2.5.3 Inferência filogenética

Os dados foram analisados de forma combinada utilizando-se o CONCAT ¹⁰⁴. Os métodos de agrupamento de vizinhos (*neighbor-joining* -NJ), máxima parcimônia (MP) e máxima verossimilhança (ML) foram utilizados para a reconstrução filogenética. Todas as análises foram feitas utilizando algoritmos provenientes do Phylip – *Phylogenetic Inference Package* preparado para Windows (v. 3.68). Para a análise de distância a árvore NJ foi gerada utilizando o modelo Kimura-2 parâmetro, incluindo bootstrap de 1000 pseudo-replicações. A análise de MP foi realizada usando buscas heurísticas pelo modo de rearranjo dos ramos, incluindo bootstrap de

1000 pseudo-replicações. Esse método envolve a mudança de ramos para novas partes da árvore produzindo novas topologias. Nessa análise todos os caracteres eram sem raiz e sem peso e os espaços (*gaps*) introduzidos no processo de alinhamento foram tratados como erros de dados. A árvore de ML assume relativas probabilidades de mudança de caracteres usando um modelo evolucionário. O modelo escolhido neste estudo foi selecionado utilizando-se o programa Modeltest 3.06¹²¹. Neste programa estima-se uma árvore baseada no método NJ, e com esta árvore, valores de probabilidade são calculados para uma variedade de modelos de evolução que incorporam diferentes premissas sobre os tipos de mudanças envolvidas (por exemplo, se a frequência de bases é igual ou não). Estes valores de probabilidades são então comparados utilizando-se um teste estatístico (*likelihood ratio test*) que seleciona o melhor valor de probabilidade para os dados em análise selecionando desta maneira o melhor modelo evolucionário para ser utilizado. A árvore ML foi construída incorporando o modelo de substituição de DNA, TVM+I+G (*Transversion Model plus Gamma distributed rate plus proportion of invariable sites*) incluindo bootstrap de 1000 pseudo-replicações. Assumiu-se que todos os caracteres evoluem com frequências diferentes, sendo A=0.26239, C=0.19158, G=0.23802 e T=0.30801, que a taxa de transição/transversão é igual a 1.05, as taxas de transição iguais e as taxas de transversão diferentes, o parâmetro α estimado para a distribuição gamma para estes dados foi de $\alpha = 0.45$ e a proporção de sítios invariáveis foi de 0.35. Em todas as análises, valores de bootstrap considerados significativos (robusto) foram acima de 70%, independente da repetição. Para determinar a polaridade da árvore resultante, *Helisoma trivolvis* foi incluída como grupo externo baseado na sua afinidade com o gênero *Biomphalaria*.

3.4 Desafio com cepas de *Schistosoma mansoni*

3.4.1 Amostras

Os estudos de suscetibilidade ao *S. mansoni* foram realizados conforme protocolo descrito por Pellegrino e Katz¹²² modificado por Jannotti-Passos et al.¹²³. Foram utilizados moluscos vivos mantidos no Moluscário Lobato Paraense do Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz (CPqRR), identificados através de PCR-RFLP e indicados na tabela abaixo.

Tabela 5: Amostras utilizadas no teste de suscetibilidade

Amostra	Origem geográfica	Número de amostras
<i>B. cousini</i>	Benjamin Constant, Amazonas, Brasil	100
<i>B. glabrata</i>	Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil	60

3.4.2 Metodologia

3.4.2.1 Obtenção da cepa LE de *S. mansoni*

Foram utilizados camundongos Swiss webster machos e fêmeas, com aproximadamente 40 dias de vida, criados no biotério do CPqRR, os quais foram inoculados com quantidades diferentes de cercárias de *S. mansoni* da cepa LE (isolada de paciente residente em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil e mantida em laboratório desde 1968). Estes camundongos foram sacrificados, e seus fígados triturados em liquidificador junto com solução salina a 0,85% por 1 min. Esta solução foi transferida para um cálice contendo gaze em sua abertura para a retenção de pedaços maiores de fígado e completou-se o volume total do cálice com solução salina a 0,85%. Esta solução ficou no escuro por 30 minutos e em seguida foram lavadas três vezes com água desclorada até a solução ficar limpa. Desprezou-se o sobrenadante e o sedimento contendo os ovos foi transferido para um balão volumétrico, pintado de preto de forma que apenas uma pequena parte do balão, abaixo da abertura, ficasse descoberta e em contato com a luz. Completou-se o volume com água desclorada a 28°C e o balão foi exposto à luz artificial até a eclosão dos miracídios. Os miracídios migraram em direção a luz devido ao fototropismo positivo.

3.4.2.2 Infecção dos moluscos

Foram utilizados 90 exemplares de *B. cousini* provenientes de Benjamin Constant- AM. Estes moluscos foram expostos, individualmente, a oito miracídios de *S. mansoni* da cepa LE. Para este processo foram utilizadas placas de cultura de células, com tampa, com 24 divisões cilíndricas e com capacidade de 2,5 ml cada uma. Em cada divisão foi colocado um molusco, medindo de 4 a 5 mm de diâmetro e adicionado uma alíquota de água desclorada contendo oito miracídios.

Os moluscos permaneceram em contato com os miracídios durante 4 horas sob luz artificial. Posteriormente, foram transferidos para aquários contendo sistema de água corrente e temperatura de $27\pm 1^{\circ}\text{C}$. Como controle da infecção foi utilizado 50 exemplares de *B. glabrata* provenientes da região do Barreiro (Belo Horizonte - MG) mantidas no moluscário “Lobato Paraense” infectados com dez miracídios por molusco. Como controle de mortalidade foi utilizado 10 moluscos de cada espécie, mesmas localidades e mesmos diâmetros, não infectados. (Tabela 6).

Tabela 6: Infecção individual de moluscos *Biomphalaria* com *S. mansoni* – Cepa LE

Molusco	Número de moluscos expostos	Diametro (mm)	Número de miracídios/molusco
<i>B. cousini</i>	90	4-5	8
<i>B. cousini</i> (Controle)	10	4-5	-
<i>B. glabrata</i>	50	6-8	10
<i>B. glabrata</i> (Controle)	10	6-8	-

3.4.2.3 Exame dos moluscos

Exames por exposição à luz artificial foram realizados semanalmente após 30 dias da infecção durante um período de 80 dias para verificar a presença de cercárias de *S. mansoni*. Os moluscos foram colocados, individualmente, em recipientes de vidro contendo água desclorada aquecida a 28°C , e expostos à luz artificial por 30 a 40 minutos. Decorrido esse período, os moluscos foram examinados com o auxílio de microscópio estereoscópico, para verificar a presença de cercárias. A taxa de infecção foi calculada utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Taxa de infecção} = \frac{100 \times \text{n}^{\circ} \text{ de moluscos positivos}}{\text{Total de moluscos examinados}}$$

3.5 Verificação da presença de híbridos por cruzamento

3.5.1 Amostras

Foram utilizados 32 moluscos vivos mantidos no Moluscário Lobato Paraense do Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz (CPqRR), identificados através de PCR-RFLP e indicados na tabela abaixo.

Tabela 7: Amostras utilizadas para verificação da presença de híbridos

Amostra	Origem geográfica	Número de amostras
<i>B. cousini</i>	Benjamin Constant, Amazonas, Brasil	11
<i>B. amazonica</i>	Careiro do Castanho, Amazonas, Brasil	11
Descendentes do cruzamento realizado entre as espécies acima	-----	10

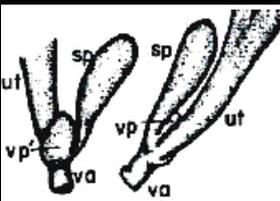
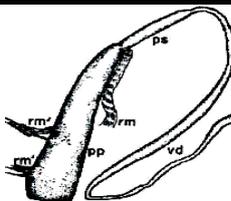
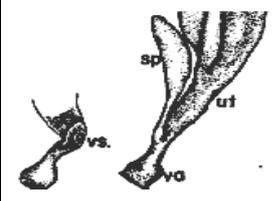
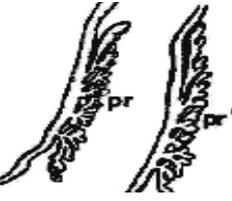
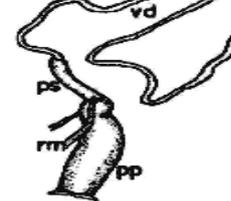
3.5.2 Metodologia

Dois moluscos adultos *B. amazonica* e *B. cousini* do moluscário “Lobato Paraense”, identificados previamente através de PCR-RFLP, foram separados individualmente até desovarem. Após eclosão, 10 exemplares da geração F₁ de cada espécie foram mantidos individualizados até alcançarem o diâmetro de 4 mm. Estes exemplares foram anestesiados com solução de hypnol (C₁₁H₁₈N₂O₃) por 2 horas, em seguida, um dos tentáculos de cada molusco foi retirado com auxílio de tesoura e submetido a extração de DNA, seguida da PCR-RFLP, para obtenção dos perfis moleculares de cada molusco. Destes dez moluscos identificados de cada espécie foi selecionado um exemplar albino de *B. amazonica* e um exemplar pigmentado de *B. cousini*, para realizar o cruzamento e verificar o perfil molecular dos descendentes. Estes caramujos ficaram em um mesmo recipiente por uma semana e após esse período, foram separados. Diariamente, o recipiente contendo o molusco albino foi observado para verificação da presença de desova. As desovas foram retiradas desse recipiente e observadas por até sete dias após a postura. Todos os dias, cada desova era analisada em microscópio estereoscópico, para a observação da região ocular. A presença de mancha ocular nesta região significava o sucesso do cruzamento, isto é, havia filhotes pigmentados oriundos de parental albino. Desses, dez filhotes foram individualizados, até atingirem o diâmetro de 5mm. Estes filhotes tiveram um de seus tentáculos retirado para a extração de DNA e seus perfis moleculares foram identificados através da PCR-RFLP conforme já descrito. Como controle foi utilizado DNA de *B. amazonica*, *B. cousini* e de um híbrido.

4.1 Identificação morfológica

Os moluscos foram identificados morfológicamente segundo Paraense^{4, 8, 46-47}. A morfologia dos exemplares que apresentaram o perfil colombiano na PCR-RFLP (três fragmentos) coincidiu com a morfologia descrita para *B. cousini*. Os exemplares com perfil boliviano na PCR-RFLP (cinco fragmentos) coincidiram com a descrição morfológica para *B. amazonica*. Os exemplares cujo perfil molecular era de híbrido na PCR-RFLP (figura 12, canaletas 3-5 e 27), possuíam caracteres morfológicos predominantemente de *B. amazonica*, esporadicamente de *B. cousini* e alguns apresentaram formas intermediárias. A tabela 8 mostra as principais características anatômicas verificadas nos exemplares analisados nesta dissertação.

Tabela 8: Características da anatomia de *B. amazonica*, *B. cousini* e híbridos.

Molusco	Bolsa da Vagina	Divertículos do Ovíteste	Divertículos da Próstata	Complexo peniano	
<i>B. amazonica</i>					
<i>B. cousini</i>					
híbridos	A 3957	-----	<i>B. cousini</i>	<i>B. amazonica</i>	<i>B. amazonica</i>
	B 3958	<i>B. amazonica</i>	<i>B. cousini</i>	<i>B. amazonica</i>	<i>B. amazonica</i>
	C 3959	<i>B. amazonica e B. cousini</i>	<i>B. amazonica</i>	-----	<i>B. amazonica</i>
	D 3960	<i>B. cousini</i>	<i>B. amazonica</i>	<i>B. cousini</i>	<i>B. amazonica</i>

Legenda: cc: canal coletor do ovoteste, ot: ovoteste, ot': ovoteste de espécime jovem, pp: prepúcio, pr: próstata, pr': próstata de outro espécime, ps: bainha do pênis, rm: principal músculo retrator do complexo peniano, rm': músculos retratores acessórios do complexo peniano, sp: espermateca, ut: útero, va: vagina, vd: vaso deferente, vp: bolsa vaginal, vp': bolsa vaginal vista pelo lado ventral, vs: porção cefálica dilatada da vagina⁴.

4.2 PCR-RFLP

4.2.1 Amplificação da região ITS- rDNA

A amplificação da região espaçadora transcrita interna do gene do RNA ribossomal (ITS-rDNA) utilizando os iniciadores ETTS1 e ETTS2¹¹⁴ gerou fragmentos de aproximadamente 1200 pares de bases para todas as espécies analisadas (dados não mostrados).

4.2.2 Produção dos perfis de restrição da região ITS-rDNA

A enzima *DdeI* gerou um perfil igual para todas as amostras da Colômbia (Figura 12 canaletas 15-22), com fragmentos de aproximadamente 490, 430 e 320 pb e nesta dissertação denominado de perfil colombiano. As amostras da Bolívia (Figura 12 canaletas 28-34) também apresentaram perfis iguais entre si, com fragmentos de aproximadamente 490, 320, 200, 120 e 110 pb, nesta dissertação denominados de perfil boliviano. Por outro lado, as amostras do Brasil apresentaram três perfis diferentes para amostras de uma mesma localidade. As amostras de Benjamin Constant (Figura 12 canaletas 2-7) e de Barão de Melgaço (Figura 12 canaletas 23-27) apresentaram o perfil colombiano (canaletas 2, 6 e 24), o boliviano (canaletas 7, 23, 25 e 26) e um terceiro perfil (canaletas 3-5 e 27), com todos os fragmentos anteriores, denominado de perfil híbrido. As amostras de Careiro do Castanho (Figura 12 canaletas 8-14) apresentaram apenas o perfil boliviano.

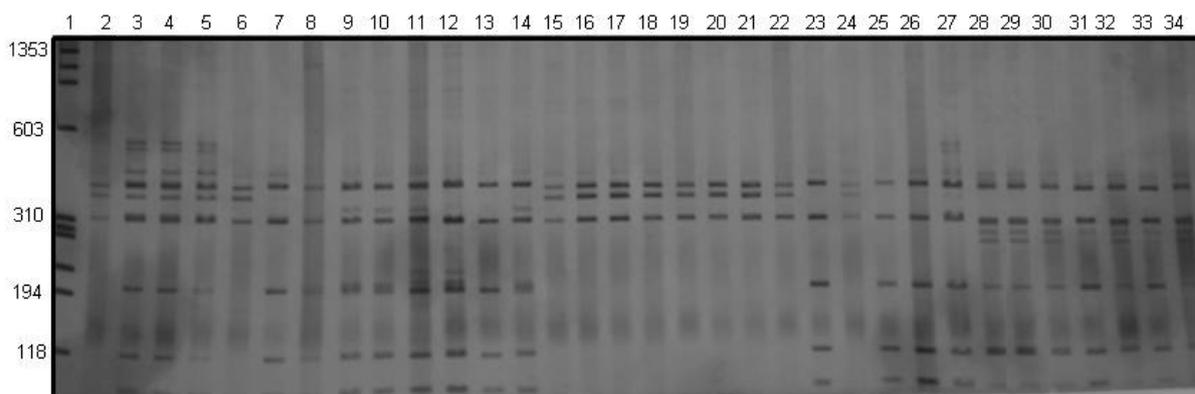


FIGURA 12: Gel de poliácridamida 6% mostrando os perfis de PCR-RFLP obtidos pela digestão da região ITS do rDNA com *DdeI* de moluscos do gênero *Biomphalaria* oriundos de: Canaletas 2-7: Benjamin Constant/AM (Brasil); 8-14: Careiro do Castanho/AM (Brasil); 15-22: Leticia (Colômbia); 23-27: Barão de Melgaço/MT (Brasil); 28-34: Santa Cruz (Bolívia). A canaleta 1 mostra o padrão de peso molecular phiX 174 digerido com *HaeIII*. Valores a esquerda do gel correspondem ao peso molecular.

4.3 Sequenciamento e Filogenia

4.3.1 Amplificação da região ITS2- rDNA

A amplificação da região espaçadora transcrita interna dois do DNA ribossomal (ITS2-rDNA) utilizando os iniciadores ETTS1¹¹⁴ e ITS2F⁵ gerou fragmentos de aproximadamente 500 pares de bases para todas os exemplares analisados. O fragmento presente abaixo deste, corresponde a resíduos da reação de PCR (Figura 13).

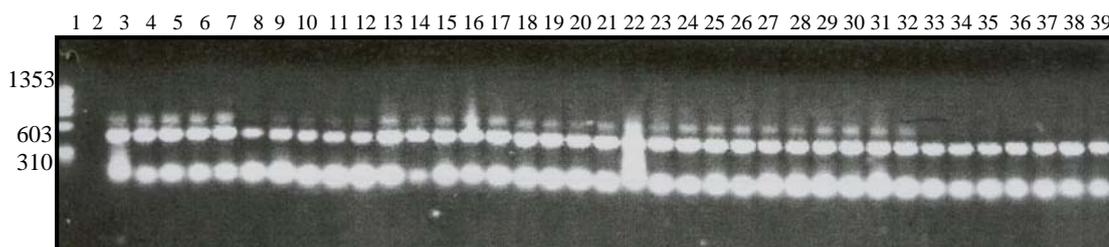


Figura 13: Gel de agarose 1% mostrando a amplificação da região ITS2 do rDNA de moluscos do gênero *Biomphalaria* oriundos de: Canaletas 3-8: Benjamin Constant/AM (Brasil); 9-16: Careiro do Castanho/AM (Brasil); 17-22: Barão de Melgaço/MT (Brasil); 23-29: Santa Cruz (Bolívia); 30-39: Leticia (Colômbia). A canaleta 1 mostra o padrão de peso molecular phiX 174 digerido com *HaeIII*. A canaleta 2 mostra um controle sem DNA. Valores a esquerda do gel correspondem ao peso molecular.

4.3.2 Amplificação de parte da região 16S do rDNAm

A amplificação de parte da região 16S do rDNAm utilizando os iniciadores 16SMIT1 e 16SMIT2¹¹⁵ gerou fragmentos de aproximadamente 450 pares de bases para todas as espécies analisadas (Figura 14).

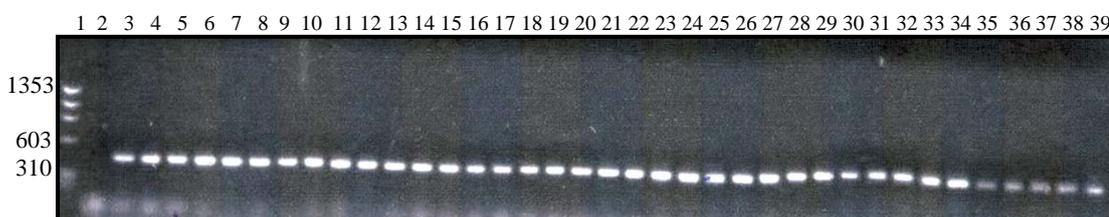


Figura 14: Gel de agarose 1% mostrando a amplificação de parte da região 16S do rDNAm de moluscos do gênero *Biomphalaria* oriundos de: Canaletas 3-8: Benjamin Constant/AM (Brasil); 9-16: Careiro do Castanho/AM (Brasil); 17-22: Barão de Melgaço/MT (Brasil); 23-29: Santa Cruz (Bolívia); 30-39: Leticia (Colômbia). A canaleta 1 mostra o padrão de peso molecular phiX 174 digerido com *HaeIII*. A canaleta 2 mostra um controle sem DNA. Valores a esquerda do gel correspondem ao peso molecular.

4.3.3 Purificação e sequenciamento

As sequências de nucleotídeos foram obtidas diretamente do produto de PCR purificado. Essas sequências foram similares às disponíveis no Genbank de parte da região 16S do rDNA mitocondrial (AY030217) e da região ITS2 do rDNA (AY030385) de moluscos *B. amazonica*.

4.3.4 Análise das sequencias

As sequencias obtidas foram analisadas no programa Phred-Phrap-consed¹¹⁶⁻¹¹⁸ para verificação da qualidade das mesmas. Esta análise gerou uma sequência consenso para cada indivíduo, que foram alinhadas utilizando-se o programa Muscle¹¹⁹. Para garantir um alinhamento ótimo foi utilizado o programa de trimagem automática de sequencias TrimAl¹²⁰.

Para inferência filogenética, os alinhamentos obtidos das duas regiões em estudo foram concatenados utilizando-se o CONCAT¹⁰⁴ cujo tamanho final foi de 783 nucleotídeos. O alinhamento dos nucleotídeos concatenados dos 69 exemplares encontra-se no anexo 1. Todas as análises foram feitas usando algoritmos provenientes do Phylip – *Phylogenetic Inference Package* preparado para Windows (v. 3.68).

O método de agrupamento de vizinhos - *neighbor-joining* (NJ) foi utilizado usando para cálculo da distância genética o modelo Kimura-2 parâmetro, incluindo “bootstrap” de 1000 pseudo-replicações.

Em todas as árvores observou-se um grupo basal constituído por *B. schrammi*, *B. peregrina*, *B. oligoza* e *B. helophila* e pelo *outgroup* *Helisoma trivolvis*.

A topologia da árvore de NJ mostra a formação de dois grandes grupos suportados por bootstrap de 85%: I) *B. obstructa* e *B. temascalensis*; II) todas as outras espécies estudadas, que se subdividiu em dois grupos suportado por bootstrap de 70%: II.1) *B. glabrata*, *B. alexandrina*, *B. choanophala*, *B. sudanica*, *B. camerunensis*, *B. pfeifferii*, *B. smithy* e *B. stanley*; II.2) todas as outras espécies estudadas, que subdividiram-se em dois grupos com valor de bootstrap 82%: II.2.1) *B. tenagophila*, *B. occidentalis* e *B.t.guaibensis*; II.2.2) todas as outras espécies estudadas, que subdividiram-se em dois grupos com valor de bootstrap 62%: II.2.2.1) *B. prona* e *B. edisoni*; II.2.2.2) as demais espécies, que subdividiram-se em dois grupos com valor de bootstrap de 78%: II.2.2.2.1) *B. straminea*, *B. kuhniana* e *B. intermedia*; II.2.2.2.2) as amostras alvo deste estudo. Este último grupo por ser

constituído de espécies muito próximas, representadas pelos baixos valores de bootstrap, foi se subdividindo em diferentes e numerosos ramos. Interessante observar que os exemplares que tiveram o perfil colombiano na PCR-RFLP agruparam-se em um único ramo isolado (quadrado laranja) suportado pelo valor de bootstrap de 70%. Os exemplares com perfil boliviano na PCR-RFLP agruparam-se com exemplares de *B. amazonica* cuja sequência nucleotídica foi obtida do GenBank, mas nenhum agrupou com os exemplares do perfil colombiano. Enquanto os exemplares com perfil híbrido (asterisco) agruparam-se tanto nos ramos dos exemplares com perfil boliviano, quanto nos ramos com os exemplares de perfil colombiano. A figura 15 mostra a árvore gerada pelo método NJ.

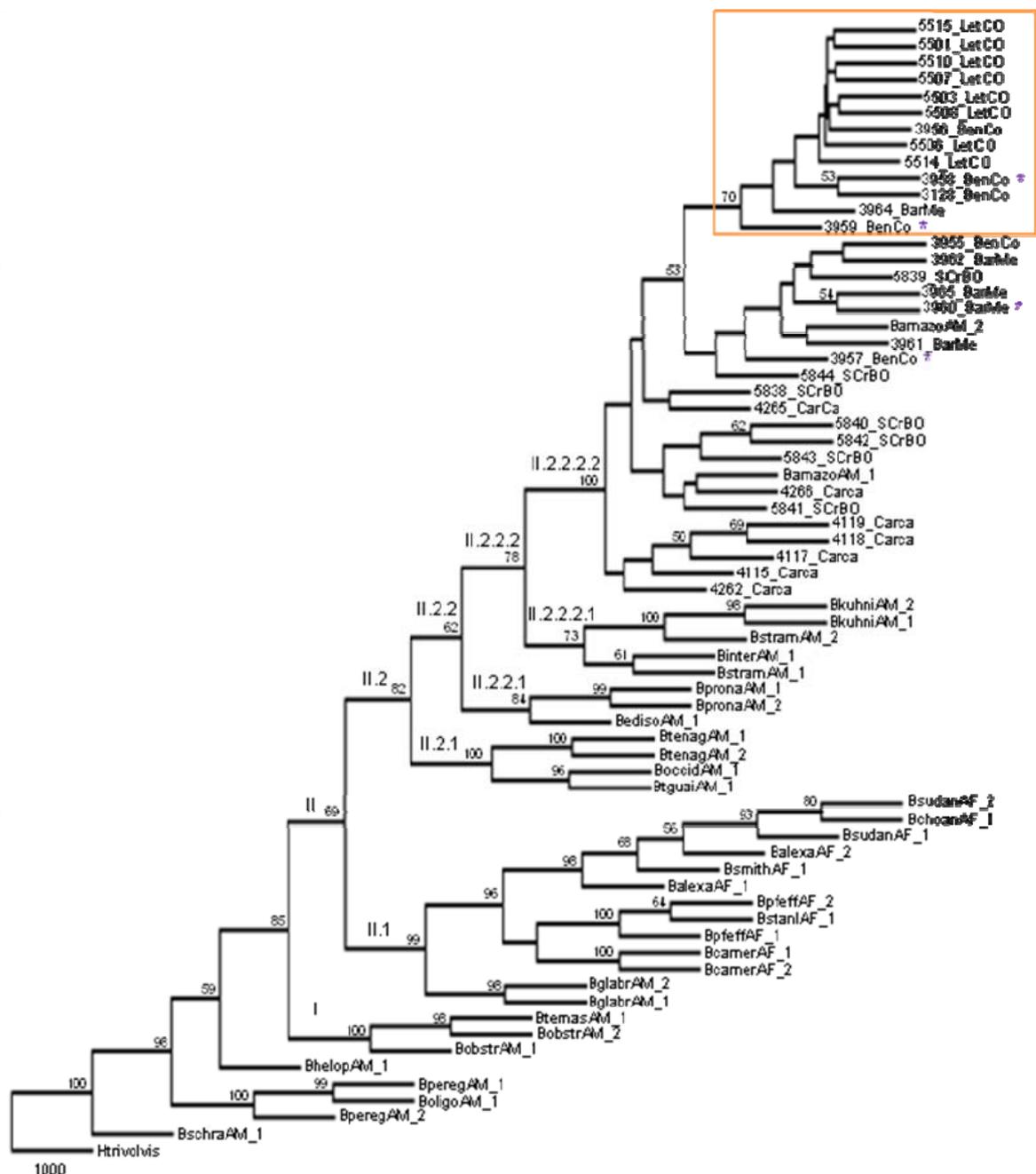


Figura 15: Árvore gerada pelo método de distância NJ utilizando-se dados combinados das regiões ITS2 do rDNA e parte da região 16S do rDNAmt. Uma numeração e uma abreviação das localidades foram utilizadas para distinguir os exemplares. Valores de bootstrap maiores que 50% estão posicionados próximos a cada nó. Espécies Americanas e Africanas estão representadas por AM e AF no final de cada nome, respectivamente. Espécies acompanhadas de (*) representam indivíduos cujo perfil de PCR-RFLP era híbrido.

A análise de MP utilizando-se a busca heurística pelo modo de rearranjo dos ramos resultou em diversas árvores mais parcimoniosas e a árvore consenso foi gerada através do método *majority rule consense*. Dos 783 nucleotídeos analisados 168 foram parcimoniosos e 615 não foram informativos. A topologia da árvore de MP mostra a formação de dois grandes grupos suportados por bootstrap de 72%: I) *B. glabrata*, *B. alexandrina*, *B. choanophala*, *B. sudanica*, *B. camerunensis*, *B. pfeifferii*, *B. smithy* e *B. stanley*; II) as demais espécies estudadas, que se subdividiram-se em dois grupos com valor de bootstrap de 52%: II.1) *B. obstructa* e *B. temascalensis*; II.2) todas as outras espécies estudadas, que subdividiram-se em dois grupos com valor de bootstrap de 62%: II.2.1) *B. tenagophila*, *B. occidentalis* e *B. t. guaibensis* em um ramo e em outro *B. prona* e *B. edisoni*; II.2.2) todas as outras espécies estudadas, que subdividiram-se em II.2.2.1) *B. straminea*, *B. kuhiana* e *B. intermedia*; II.2.2.2) as amostras alvo deste estudo. Este último grupo por ser constituído de espécies muito próximas, representado pelos valores baixos de bootstrap, foi se subdividindo em diferentes e numerosos ramos. Interessante observar que os exemplares que tiveram o perfil colombiano na PCR-RFLP agruparam-se em um único ramo isolado (quadrado laranja) suportado pelo valor de bootstrap de 65%. Os exemplares que tiveram perfil boliviano na PCR-RFLP agruparam-se com exemplares de *B. amazonica* cuja sequência nucleotídica foi obtida do GenBank, mas nenhum agrupou com os exemplares do perfil colombiano. Enquanto os exemplares que tiveram perfil híbrido (asterisco) agruparam-se tanto nos ramos dos exemplares com perfil boliviano, como nos ramos com os exemplares de perfil colombiano. A figura 16 mostra a árvore gerada pelo método MP.

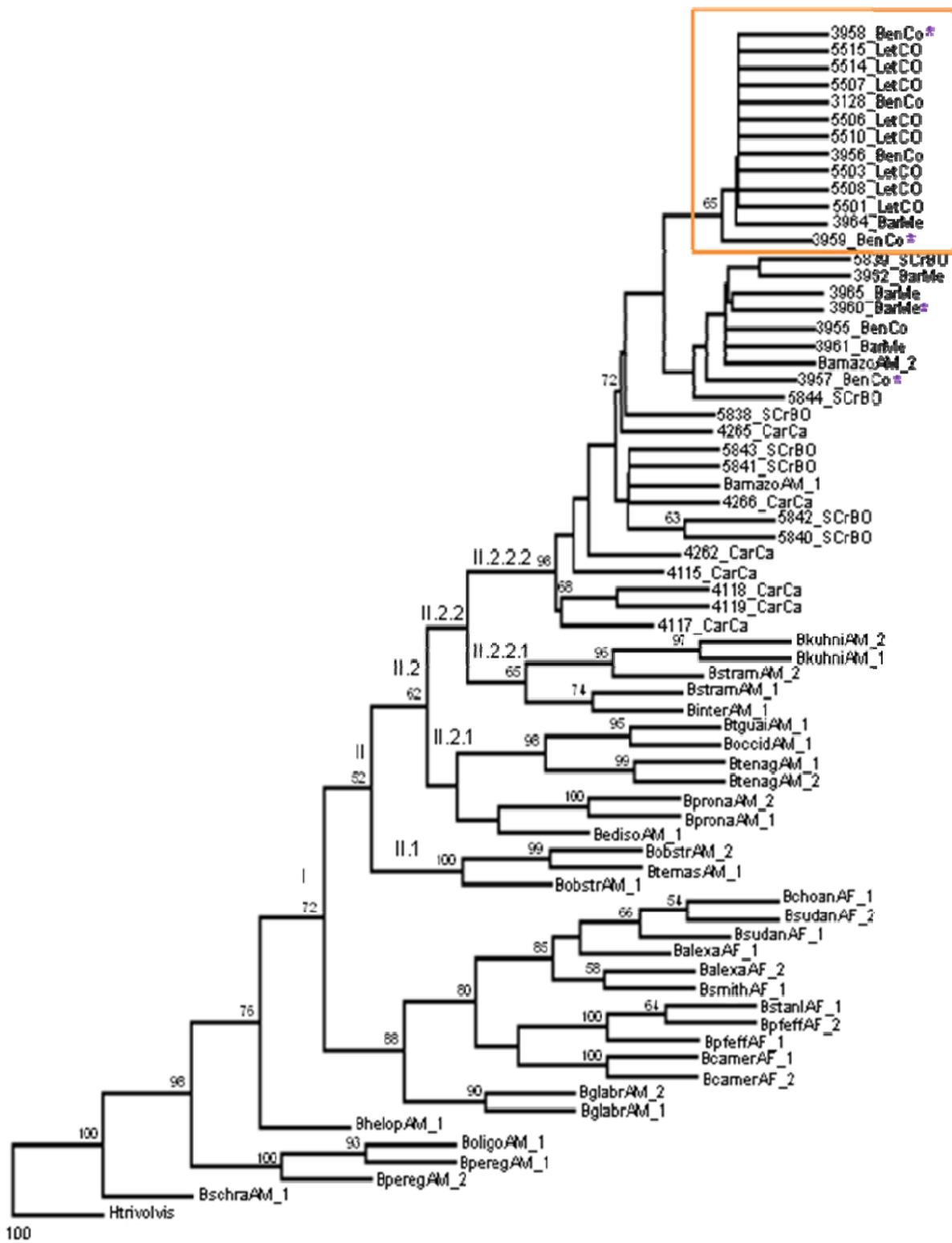


Figura 16: Árvore gerada pelo método MP utilizando-se dados combinados das regiões ITS2 do rDNA e parte da região 16S do rDNAm. Uma numeração e uma abreviação das localidades foram utilizadas para distinguir os exemplares alvos do estudo. Valores de bootstrap maiores que 50% estão posicionados próximos a cada nó. Espécies Americanas e Africanas estão representadas por AM e AF no final de cada nome, respectivamente. Espécies acompanhadas de (*) representam indivíduos cujo perfil de PCR-RFLP era híbrido.

A análise de ML foi realizada utilizando-se o modelo evolucionário TVM+I+G resultou em diversas árvores e a árvore consenso gerada através do método *majority rule consense* foi analisada. A topologia da árvore de ML mostra a formação de dois grandes grupos: I) *B. obstructa* e *B. temascalensis*; II) as demais espécies estudadas, que subdividiram-se em dois grupos: II.1) *B. glabrata*, *B. alexandrina*, *B. choanophala*, *B. sudanica*, *B. camerunensis*, *B. pfeifferii*, *B. smithy* e *B. stanley*; II.2) todas as outras espécies estudadas. Esse grupo subdividiu-se em dois grupos com valor de bootstrap 66%: II.2.1) *B. tenagophila*, *B. occidentalis* e *B. t. guaibensis* em um ramo e em outro *B. prona* e *B. edisoni*; II.2.2) todas as outras espécies estudadas, que subdividiram-se em dois grupos com valor de bootstrap 50%: II.2.2.1) *B. straminea*, *B. kuhniiana* e *B. intermedia*; II.2.2.2) as amostras alvo deste estudo. Este último grupo por ser constituído de espécies muito próximas, representadas pelos baixos valores de bootstrap, foi se subdividindo em diferentes e numerosos ramos. Interessante observar que os exemplares que tiveram o perfil colombiano na PCR-RFLP agruparam-se em um único ramo isolado (quadrado laranja) suportado pelo valor de bootstrap de 78%. Os exemplares com perfil boliviano na PCR-RFLP agruparam-se com exemplares de *B. amazonica* cuja sequência nucleotídica foi obtida do GenBank, mas nenhum agrupou com os exemplares do perfil colombiano. Enquanto os exemplares que tiveram perfil híbrido (asterisco) agruparam-se tanto nos ramos dos exemplares com perfil boliviano, como nos ramos com os exemplares de perfil colombiano. A figura 17 mostra a árvore gerada pelo método ML.

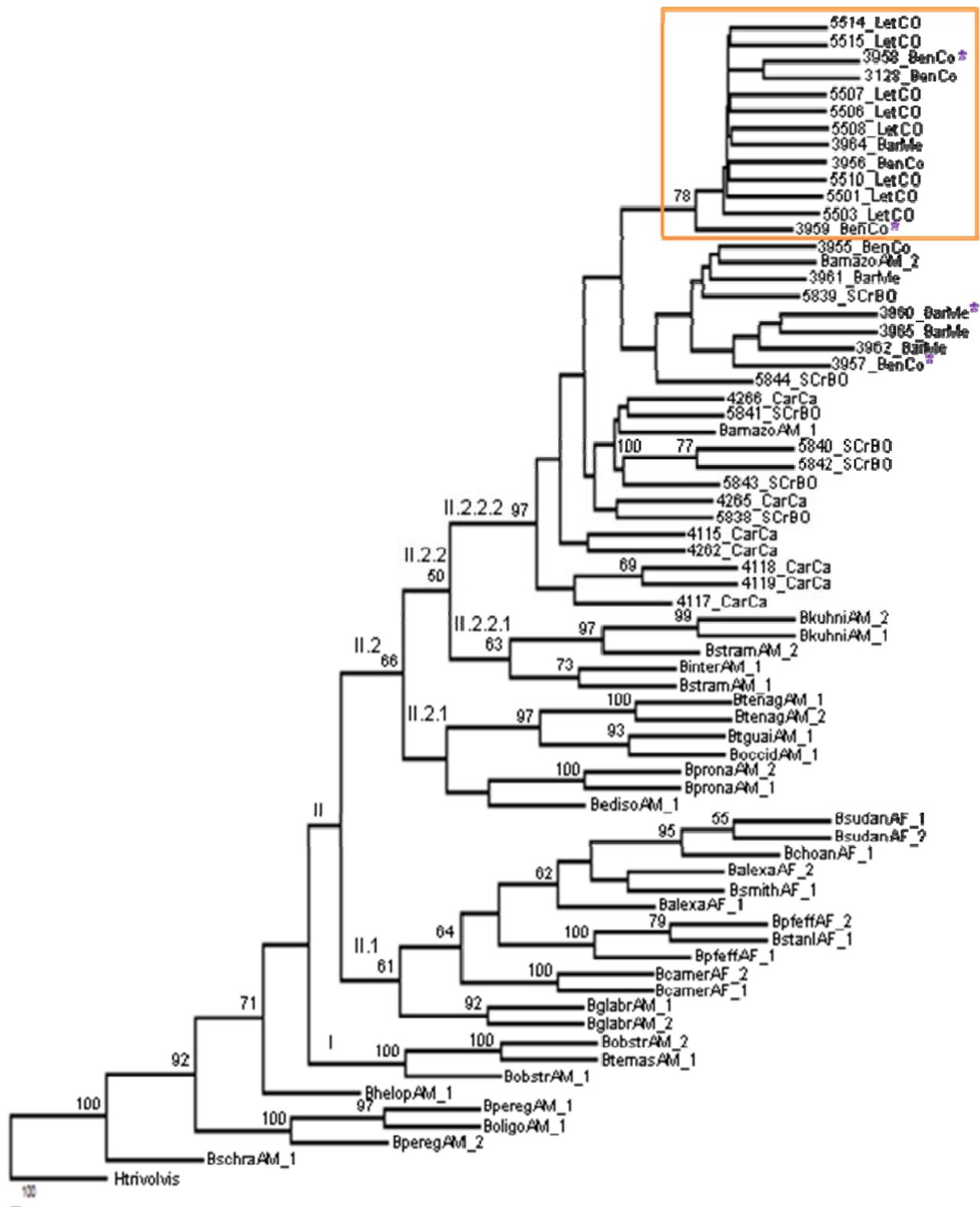


Figura 17: Árvore gerada pelo método ML utilizando-se dados combinados das regiões ITS2 do rDNA e parte da região 16S do rDNAmt. Uma numeração e uma abreviação das localidades foram utilizadas para distinguir os exemplares alvos do estudo. Valores de bootstrap maiores que 50% estão posicionados próximos a cada nó. Espécies Americanas e Africanas estão representadas por AM e AF no final de cada nome, respectivamente. Espécies acompanhadas de (*) representam indivíduos cujo perfil de PCR-RFLP era híbrido.

4.4 Desafio com cepa de *Schistosoma mansoni*

4.4.1 Infecção dos moluscos

Os moluscos utilizados no experimento de suscetibilidade apresentaram uma taxa de infecção de 31,6%, porém 71 (80,7%) morreram ao longo da infecção. Esta mortalidade também foi observada nos caramujos sem infecção das duas espécies utilizadas como controle. Nos caramujos *B. glabrata* utilizados como controle da infecção, todos se infectaram (100%) e não houve mortalidade. A tabela 10 mostra o resultado dos moluscos expostos aos miracídios de *S. mansoni*.

Tabela 9: Resultado da infecção dos moluscos com a cepa LE de *S. mansoni*

Espécie do molusco	Número de moluscos					Período prepatente (dias)	Taxa de infecção (%)
	utilizados	expostos	vivos	mortos	infectados		
<i>B. cousini</i>	90	90	19	71(78,9 %)	6	37 a 67	31,6%
<i>B. cousini</i> (controle)	10	0	2	8(80%)	-	-	-
<i>B. glabrata</i>	50	50	50	0	50	30 a 37	100%
<i>B. glabrata</i> (controle)	10	0	4	6(60%)	-	-	-

4.5 Verificação da presença de híbridos por cruzamento

O perfil da PCR-RFLP obtido do DNA do tentáculo dos parentais albino e pigmentado estão apresentados na figura 18, sendo o perfil do molusco albino correspondente ao perfil de *B. amazonica* (canaleta 12) e do molusco pigmentado de *B. cousini* (canaleta 13). O perfil dos dez filhotes pigmentados descendentes do albino, provenientes deste cruzamento (canaletas 2 a 11) corresponde ao perfil híbrido encontrado anteriormente em moluscos do campo (canaleta 14).

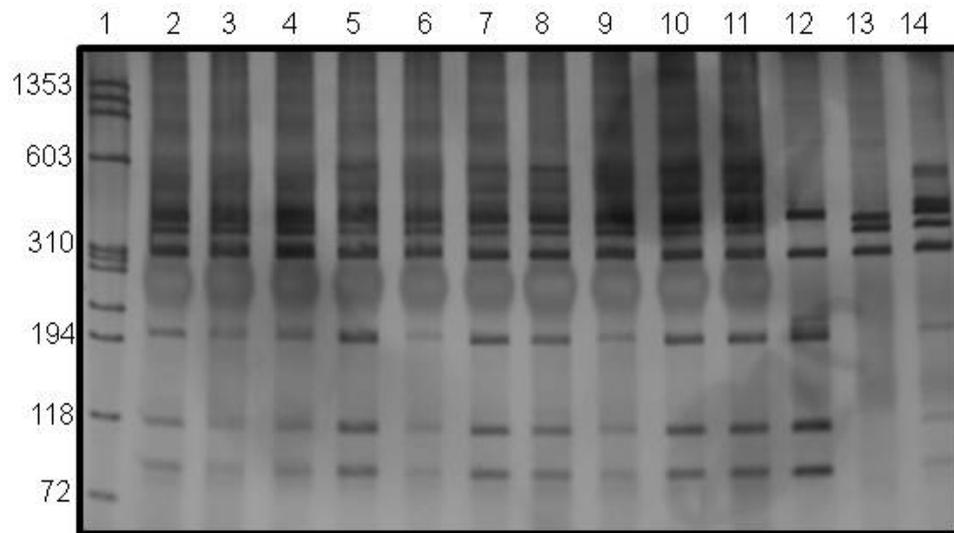


FIGURA 18: Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata mostrando os perfis de restrição obtidos pela digestão da região ITS do rDNA com a endonuclease *Ddel*. Canaletas 2-11: Filhotes pigmentados do caramujo albino proveniente do cruzamento entre *B. amazonica* albino X *B. cousini* pigmentado; 12-14: controles utilizados mãe *B. amazonica*, pai *B. cousini* e híbrido. A canaleta 1 mostra o padrão de peso molecular phiX 174 digerido com *HaeIII*. Valores a esquerda do gel correspondem ao peso molecular.

É relatada, pela primeira vez, a presença de *B. cousini* no Brasil. Este registro foi confirmado através de caracteres morfológicos, técnica molecular e por inferência filogenética.

A possibilidade da utilização de técnicas moleculares na identificação de moluscos do gênero *Biomphalaria* tem contribuído com o aumento do conhecimento sobre este gênero. Técnicas moleculares como análises de PCR-RFLP vem sendo amplamente utilizadas^{2, 49, 56, 73, 77-80, 83, 86}. Neste trabalho, diferentes perfis moleculares foram detectados para populações previamente identificadas como *B. amazonica*, corroborando com os resultados obtidos por Vidigal et al.². Porém, quando foram estudados moluscos da Colômbia e da Bolívia, foi observada a presença de perfis exclusivos para cada uma das populações (perfil colombiano e boliviano respectivamente). Esses perfis foram observados também nos exemplares brasileiros, entretanto, além destes perfis, foi obtido um terceiro perfil constituído pelos fragmentos observados nos dois perfis anteriores e denominado de perfil híbrido. Estudos utilizando-se a técnica de PCR-RFLP para a identificação de espécies de moluscos do gênero *Biomphalaria* semelhantes morfológicamente já foram realizados com sucesso^{49, 82, 83}. Nos estudos realizados por Vidigal et al.² com *B. amazonica*, a diversidade de perfis observada foi considerada uma variação intraespecífica que necessitava de maiores estudos, contudo, Caldeira et al.³ utilizando maior número de exemplares sugeriu que essa diversidade poderia ser resultado da identificação de duas espécies (*B. amazonica* e *B. cousini*) e não apenas de uma como havia sido dito e que o terceiro perfil observado poderia ser o resultado de um híbrido entre essas espécies. Nossos resultados obtidos através da PCR-RFLP confirmaram o apresentado por Caldeira et al.³ sugerindo que essas espécies poderiam ter sido identificadas erroneamente sendo, alguns exemplares *B. cousini*, ao invés de *B. amazonica*. Em virtude disto, o presente estudo foi realizado com o objetivo de elucidar essas diferenças moleculares e verificar se elas correspondem a *B. amazonica* ou a *B. cousini*.

Apesar dos esforços para se estabelecer uma correta identificação específica desses moluscos, muitas vezes ocorrem divergências taxonômicas devido às variações nos caracteres morfológicos, ao estado de distensão de cada órgão no momento da fixação, ao pequeno tamanho de alguns exemplares e, ainda à grande semelhança entre algumas espécies^{8, 47, 124}. Nesta dissertação os caracteres morfológicos foram imprescindíveis para esclarecer os perfis moleculares observados, uma vez que os perfis “boliviano” e “colombiano” representavam

moluscos com características morfológicas de *B. amazonica* e *B. cousini*, respectivamente, conforme descrito por Paraense ⁴. Os exemplares que exibiram o perfil híbrido apresentaram caracteres morfológicos predominantes de *B. amazonica* e esporadicamente de *B. cousini*, sugerindo novamente que esses exemplares poderiam ser o resultado de um híbrido entre essas duas espécies. Paraense ⁴ enfatiza a dificuldade envolvida na identificação morfológica dessas duas espécies devido à grande similaridade morfológica, sendo que por isso, provavelmente, elas foram descritas no mesmo artigo. As principais características que as distinguem são a presença de uma bolsa arredondada e bem desenvolvida em *B. amazonica* e digitiforme e pequena em *B. cousini*; o diâmetro da bainha do pênis é mais longo ao diâmetro da porção mais larga do vaso deferente em *B. cousini* e igual em *B. amazonica*; divertículos do ovoteste bem arredondados e em grande número em *B. amazonica* e em menor número em *B. cousini*. Outros moluscos do gênero *Biomphalaria* também possuem uma grande semelhança morfológica dificultando a correta identificação dessas espécies. Este é o caso dos moluscos pertencentes aos complexos de espécies existentes neste gênero, complexo *B. straminea* ⁴⁷ e complexo *B. tenagophila* ⁴⁹, sendo necessário o exame de um grande número de exemplares de ambas as espécies para uma correta identificação. Nossos achados morfológicos enfatizam esta grande similaridade nos caracteres morfológicos apresentados pelo gênero *Biomphalaria*, porém, a correta identificação dos exemplares analisados em duas espécies muito semelhantes foi possível através da análise minuciosa do sistema reprodutor masculino e feminino dos moluscos. Além disso, os resultados obtidos através da PCR-RFLP confirmam os achados morfológicos mostrando que esta técnica, de simples e rápida execução pode ser utilizada como uma ferramenta auxiliar a identificação morfológica e que a região ITS do rDNA contém marcadores genéticos úteis para a identificação destes moluscos.

Estas variações entre estes moluscos também foram observadas nos estudos das relações filogenética entre as espécies do gênero *Biomphalaria* realizados por Vidigal et al. ⁵, DeJong et al. ⁶ e Estrada et al. ⁷. Nestes estudos, o ramo que continha os exemplares de *B. amazonica*, sempre se ramificaram em dois grupos, próximos, porém distintos. Este fato, sugere a presença das duas espécies que equivocadamente estão sendo identificadas como *B. amazonica*. Observa-se na árvore gerada no artigo da Vidigal et al. ⁵ que os exemplares B.a AM-1 e B.a AM-2 estão agrupados e separados do B.a AM-3, esses moluscos correspondem, respectivamente, às localidades de Benjamin Constant/AM e Barão de Melgaço/MT.

Esses exemplares foram utilizados no artigo de Vidigal et al. ² e apresentaram respectivamente perfil molecular correspondente ao perfil colombiano e boliviano. Nas árvores geradas por DeJong et al. ⁶ e Estrada et al. ⁷ os exemplares *B. amazonica* AM Brasil e *B. amazonica* RO Brasil agruparam-se, enquanto, outro exemplar (*B. sp.* Bolívia) que não havia sido identificado, posicionou-se próximo, porém em outro ramo.

No presente estudo, as relações entre essas populações foram estudadas aumentando-se o número de exemplares e localidades para melhor compreensão dessas variações. Para isso, várias espécies de moluscos foram utilizadas para uma verdadeira polarização dos ramos. A topologia das árvores e a relação entre as espécies estudadas estão de acordo com os estudos anteriores de Vidigal et al. ⁵, DeJong et al. ⁶ e Estrada et al. ⁷ e com os resultados aqui obtidos através da PCR-RFLP e da identificação morfológica. Dois grupos foram formados, um contendo todos os espécimes que exibiram o perfil colombiano e o outro formado pelos exemplares que exibiram o perfil boliviano, indicando desta maneira que os exemplares em estudo não se tratavam de apenas uma espécie como havia sido previamente estabelecido, mas sim de duas espécies, *B. amazonica* e *B. cousini*. Até o momento, poucos estudos têm sido realizados com *B. amazonica* e, nenhum foi realizado com *B. cousini*, o que dificulta a compreensão destas espécies. De fato, os baixos valores de bootstrap encontrados tanto nos ramos das populações de *B. amazonica* quanto no ramo de *B. cousini*, indicam a proximidade destas espécies, enfatizando o observado na morfologia. *B. amazonica* já foi registrada para Amazonas ⁴, Acre e Rondônia ⁵³ Mato Grosso ²⁸ Mato Grosso do Sul ⁵⁴ Bolívia ⁵⁵ e Colômbia ⁵⁶. *B. cousini* só foi relatada até o momento para o Equador, o que seria seu único local de ocorrência. Nossos resultados da filogenia associados com os obtidos através da morfologia e da PCR-RFLP, confirmam que os exemplares com perfil “colombiano” são *B. cousini* ao invés de *B. amazonica* aumentando desta maneira a abrangência desta espécie para o Brasil (Benjamin Constant/AM e Barão de Melgaço/MT) e Colômbia (Letícia).

Uma vez definido o perfil de *B. amazonica* (boliviano) e o perfil da *B. cousini* (colombiano) seria realmente o terceiro perfil, que apresenta a associação destes dois perfis, o resultado de um híbrido entre essas duas espécies? Nossos resultados sugerem a presença de um híbrido natural entre *B. amazonica* e *B. cousini* fornecendo evidências para a confirmação destes híbridos. Os exemplares com perfil híbrido na PCR-RFLP, no estudo de inferência filogenética agruparam-se tanto no

ramo que continha os exemplares de *B. cousini* quanto nos ramos com os exemplares de *B. amazonica*. Além disso, a análise morfológica desses exemplares evidenciou a presença de caracteres presentes nas duas espécies. Nossos resultados não deixam dúvidas quanto a presença de um híbrido entre *B. amazonica* e *B. cousini*, mas para se confirmar esta hipótese, foi realizado o cruzamento entre *B. cousini* e *B. amazonica* utilizando-se o fator albinismo como marcador genético. Experimentos baseados em cruzamentos de moluscos do gênero *Biomphalaria* têm sido realizados desde a década de 50 ^{1, 16, 125}. Cruzamentos propostos entre *B. glabrata* e *B. tenagophila* não foram viáveis reportando o isolamento reprodutivo para as populações estudadas ¹²⁵. Contudo, o cruzamento entre moluscos do gênero *Biomphalaria* que produziram híbridos férteis também já foi relatado como, por exemplo, o cruzamento entre *B. alexandrina* x *B. glabrata* ¹²⁶ *B. straminea* x *B. peregrina* e *B. tenagophila* x *B. peregrina* ¹²⁷ *B. glabrata* x *B. tenagophila* ¹²⁸. Barbosa ¹²⁹ comenta a hibridização natural entre *B. glabrata* e *B. tenagophila* gerando híbridos com formas intermediárias. Posteriormente, Barbosa ¹³⁰ descreve observações realizadas durante três anos sobre o processo de substituição de *B. glabrata* por *B. straminea*, em coleções hídricas do Nordeste do Brasil, no qual encontrou quatro exemplares os quais chamou de híbridos interespecíficos. Apenas durante este processo de exclusão competitiva, formas mistas foram encontradas, possivelmente, como resultado do cruzamento entre estas espécies. Decorridos esses três anos, novos estudos de campo foram realizados e essas formas intermediárias não foram encontradas, sugerindo que exista uma seleção natural contra estes híbridos inabilitando-os de persistir na natureza. Confirmando nossas especulações, os descendentes pigmentados provenientes do caramujo albino do cruzamento entre *B. amazonica* e *B. cousini*, possuíam o perfil híbrido (Figura 18). Desta maneira, o presente estudo confirma que estas duas espécies produzem híbridos e admite da mesma maneira, que nossos resultados estão de acordo com Barbosa ¹²⁹ sugerindo a presença de um híbrido natural entre *B. cousini* e *B. amazonica*, evidenciando a presença de formas intermediárias. Mello-Silva ¹²⁸ comenta que os resultados de fertilidade e fecundidade produzidos por híbridos férteis mostraram que a geração F2 não foi tão eficiente quanto a geração F1, o que poderia ser explicado pela teoria da especiação alopátrica, envolvendo a formação de uma geração de híbridos F1 normal, vigorosa e fértil, mas uma fraca geração F2 com a presença de alguns indivíduos estéreis. Entretanto, nossos resultados sobre a

fertilidade dos híbridos são inconclusivos e outros estudos fazem-se necessários para um melhor entendimento sobre a biologia desses híbridos.

Uma vez definida a população de *B. amazonica*, *B. cousini* e de híbrido surge uma última questão: Seria *B. cousini* suscetível a *S. mansoni*? Nenhum teste de suscetibilidade havia sido realizado com esta espécie até o momento e devido à dificuldade de manter *B. cousini* sobre condições laboratoriais poucos exemplares foram expostos ao *S. mansoni* neste estudo. A cepa LE de *S. mansoni*, foi escolhida, uma vez que em experimentos prévios de susceptibilidade mostrou-se altamente infectiva para a maioria das espécies estudadas ³⁸. Algumas espécies de *Biomphalaria* têm apresentado variado grau de suscetibilidade à infecção por *S. mansoni* ^{11, 22-23, 28-29}. Exemplares de *B. amazonica* de Careiro da Várzea (AM) mostraram ser altamente susceptíveis à infecção com duas cepas de *S. mansoni* (BH e SJ) com uma taxa de infecção de 48% e 73% respectivamente ¹⁰. Estudo realizado utilizando *B. amazonica* de Porto Velho (RO) mostrou um baixo grau de compatibilidade entre a população estudada e a cepa utilizada (SJ) com taxa de infecção de 3,5% ²⁸. Fernandez e Thiengo ²⁹ confirmaram este resultado quando, utilizando *B. amazonica* de Mato Grosso com três cepas de *S. mansoni* (BH, SJ e EC) observaram taxa de infecção de 3,79%, 13,63%, 9,09% respectivamente.

Nossos resultados mostraram que *B. cousini* é susceptível a infecção com a cepa LE, apresentando alta taxa de infecção (31,6%). Entretanto, alta taxa de mortalidade foi observada quando comparada com os caramujos infectados utilizados como controle. Este resultado pode ser devido a um ajuste entre a cepa do parasito e a colônia de caramujos e devido à quantidade de miracídios expostos. Cada molusco foi exposto a oito miracídios, o que não é esperado em condições naturais, uma vez que em organismos pequenos, como *B. cousini*, o crescimento e a multiplicação de tantos parasitos irão provocar mudanças significativas no desenvolvimento do caramujo de modo que poderá ocorrer mortalidade antes do parasito atingir seu desenvolvimento completo. Uma alta taxa de mortalidade também foi observada nos caramujos utilizados como controle não infectados. Isto pode ser devido a algum problema nestes aquários como presença de cloro na água ou contaminação, que impossibilitaram o desenvolvimento destes moluscos. Do mesmo modo, um longo período pré-patente foi observado, pois enquanto todos os *B. glabrata* estavam eliminando cercárias com até 37 dias após a exposição, os exemplares de *B. cousini* começaram a eliminar cercárias com até 67 dias após a exposição. De qualquer maneira, *B. cousini* mostrou-se capaz de infectar-se

experimentalmente, mas novos experimentos utilizando-se cepas diferentes de *S. mansoni* e maior número de moluscos devem ser realizados de modo a clarear a classificação dessa espécie quanto ao seu *status* de hospedeira.

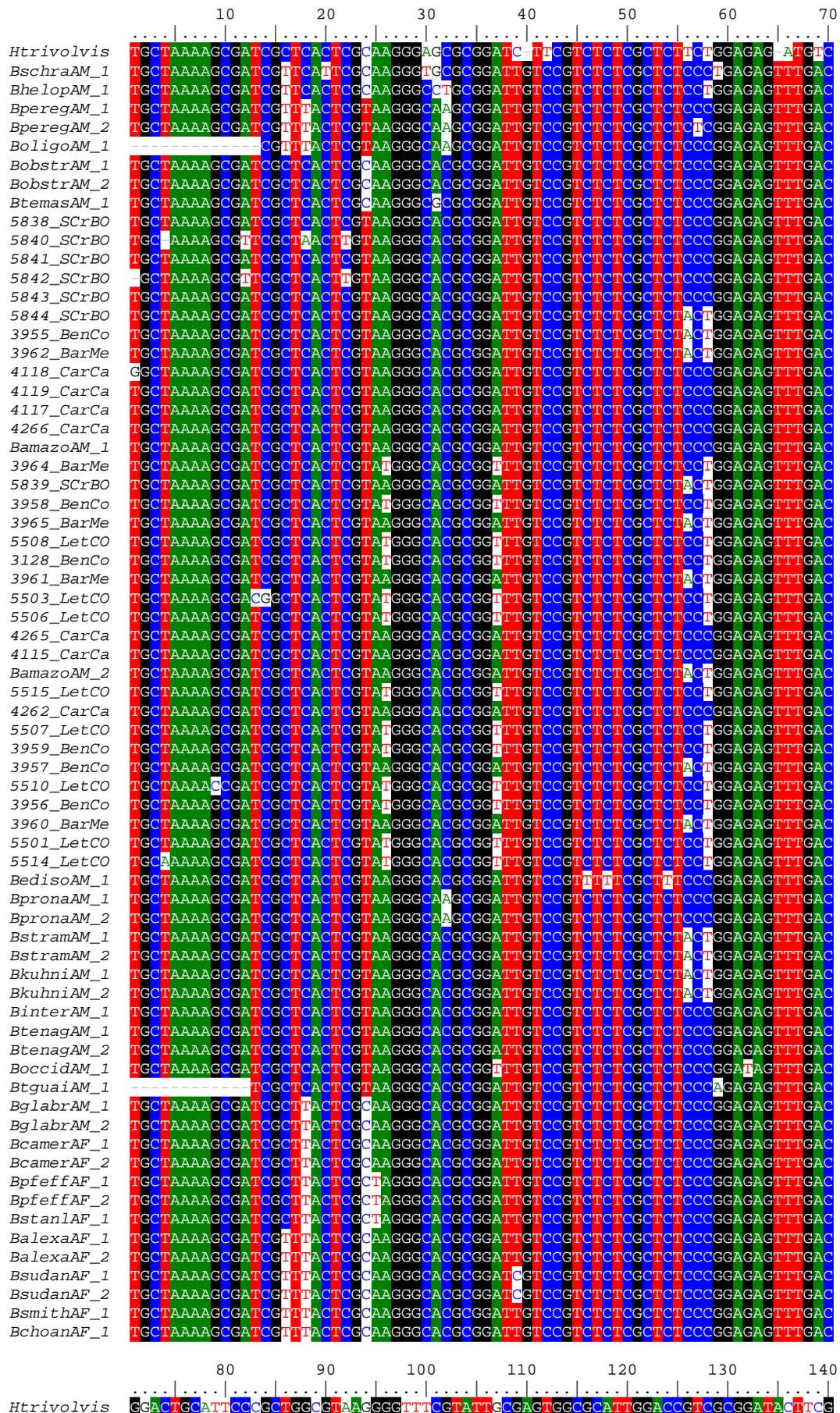
Este trabalho foi realizado com o intuito de esclarecer algumas questões que permaneciam obscuras em relação a *B. amazonica* e *B. cousini*, porém novas questões foram levantadas com o decorrer de seu desenvolvimento como por exemplo, estes híbridos encontrados são férteis? Até que geração? Será que a *B. amazonica* realmente é um hospedeiro em potencial ou no momento em que a infecção foi realizada ela estava misturada com *B. cousini*? O híbrido se infecta? Maiores estudos serão necessários para responder todas estas questões. Dessa maneira, como perspectivas para o próximo trabalho, pretendemos realizar diversos cruzamentos entre *B. amazonica*, *B. cousini* e híbrido para esgotar todas as possibilidades possíveis de cruzamentos entre essas espécies. Além disso, pretendemos estabelecer uma colônia de cada uma dessas populações de moluscos para realizarmos as infecções com diferentes cepas de *S. mansoni* e resolver todas as questões acerca de suscetibilidade fato este que só não foi possível nesta dissertação uma vez que estes caramujos são difíceis de serem criados em condições laboratoriais requerendo um tempo de dedicação maior.

De fato, a correta identificação dos moluscos do gênero *Biomphalaria* é importante para a melhoria dos trabalhos de vigilância epidemiológica da esquistossomose, uma vez que permite detectar com exatidão as espécies presentes em áreas de transmissão, bem como em áreas indenes que na presença de espécies suscetíveis a *S. mansoni* podem vir a se tornar foco da doença. Assim, com nossos resultados a carta planorbídica dos moluscos brasileiros do gênero *Biomphalaria* foi acrescida de mais uma espécie, *Biomphalaria cousini*, encontrada nos Estados do Mato Grosso e Amazonas. Além disso, esta espécie pode ser considerada hospedeira em potencial do *S. mansoni*, ampliando a possibilidade da introdução da esquistossomose nessas áreas.

-  A fauna brasileira do gênero *Biomphalaria* foi acrescida de mais uma espécie, *Biomphalaria cousini*, encontrada nos Estados do Mato Grosso e Amazonas;
-  A associação da taxonomia clássica com técnicas moleculares foi eficiente para a identificação de *B. cousini*;
-  *Biomphalaria cousini* foi suscetível à cepa LE de *S. mansoni*;
-  O cruzamento entre *B. cousini* e *B. amazonica* produziu híbridos.

Anexo 1: Alinhamento dos dados combinados das regiões ITS2 do rDNA e parte da região 16S do

rDNAmT das amostras utilizadas nos estudos filogenéticos.



BkuhniAM_2 AGAAAAAGACGAGAAGACCCCTTAGAGTTTATAATTTTGTGGGGCAGAGCTAAACATTTAAACTT
BinterAM_1 AGAAAAAGACGAGAAGACCCCTTAGAGTTTATAATTTTGTGGGGCAGAGCTAAACAAACAAACTT
BtenagAM_1 AGAAAAAGACGAGAAGACCCCTTAGAGTTTATAATTTTGTGGGGCAGAGCTAAACATTTGAACTT
BtenagAM_2 AGAAAAAGACGAGAAGACCCCTTAGAGTTTATAATTTTGTGGGGCAGAGCTAAACATTTGAACTT
BoccidAM_1 AGAAAAAGACGAGAAGACCCCTTAGAGTTTATAATTTTGTGGGGCAGAGCTAAACATTTAAACTT
BtguaiAM_1 AGAAAAAGACGAGAAGACCCCTTAGAGTTTATAATTTTGTGGGGCAGAGCTAAACATTTAAACTT
BglabrAM_1 AGAAAAAGACGAGAAGACCCCTTAGAGTTTATAATTTTGTGGGGCAGAGCTAAACATTTAAACTT
BglabrAM_2 AGAAAAAGACGAGAAGACCCCTTAGAGTTTATAATTTTGTGGGGCAGAGCTAAACATTTAAACTT
BcamerAF_1 AGAAAAAGACGAGAAGACCCCTTAGAGTTTATAATTTTGTGGGGCAGAGCTAAACATTTAAACTT
BcamerAF_2 AGAAAAAGACGAGAAGACCCCTTAGAGTTTATAATTTTGTGGGGCAGAGCTAAACATTTAAACTT
BpfeffAF_1 AGAAAAAGACGAGAAGACCCCTTAGAGTTTATAATTTTGTGGGGCAGAGCTAAACATTTAAACTT
BpfeffAF_2 AGAAAAAGACGAGAAGACCCCTTAGAGTTTATAATTTTGTGGGGCAGAGCTAAACATTTAAACTT
BstanlAF_1 AGAAAAAGACGAGAAGACCCCTTAGAGTTTATAATTTTGTGGGGCAGAGCTAAACATTTAAACTT
BalexaAF_1 AGAAAAAGACGAGAAGACCCCTTAGAGTTTATAATTTTGTGGGGCAGAGCTAAACATTTAAACTT
BalexaAF_2 AGAAAAAGACGAGAAGACCCCTTAGAGTTTATAATTTTGTGGGGCAGAGCTAAACATTTAAACTT
BsudanAF_1 AGAAAAAGACGAGAAGACCCCTTAGAGTTTATAATTTTGTGGGGCAGAGCTAAACATTTAAACTT
BsudanAF_2 AGAAAAAGACGAGAAGACCCCTTAGAGTTTATAATTTTGTGGGGCAGAGCTAAACATTTAAACTT
BsmithAF_1 AGAAAAAGACGAGAAGACCCCTTAGAGTTTATAATTTTGTGGGGCAGAGCTAAACATTTAAACTT
BchoanAF_1 AGAAAAAGACGAGAAGACCCCTTAGAGTTTATAATTTTGTGGGGCAGAGCTAAACATTTAAACTT

..... 640 650 660 670 680 690 700
Htrivolv TACCCTTTTATAATCGATTTTATTAATAATAAAAACTACCTTAGGGATAACAGCATTATTTTAAATA
BschraAM_1 TAAATTAATAATCGATTTTATAATAATAATAAAAACTACCTTAGGGATAACAGCATTATTTTAAATA
BhelepAM_1 TATATTTTATAATCGATTTTATAAGAAATAAAAACTACCTTAGGGATAACAGCATTATACATAAAAA
BperegAM_1 TATAATTAATAATCGATTTTATAAGAAATAAAAACTACCTTAGGGATAACAGCATTATTTTAAATA
BperegAM_2 TATAATTAATAATCGATTTTATAAGAAATAAAAACTACCTTAGGGATAACAGCATTATTTTAAATA
BoligoAM_1 TATAATTAATAATCGATTTTATAAGAAATAAAAACTACCTTAGGGATAACAGCATTATTTTAAATA
BobstrAM_1 TACTATAATTAATCGATTTTATAAGAAATAAAAACTACCTTAGGGATAACAGCATTATTTTAAATA
BobstrAM_2 TACTATAATTAATCGATTTTATAAGAAATAAAAACTACCTTAGGGATAACAGCATTATTTTAAATA
BtemasAM_1 TACTATAATTAATCGATTTTATAAGAAATAAAAACTACCTTAGGGATAACAGCATTATTTTAAATA
5838_SCrBO TACGATAAAGTAAATCGATTTTATAAGAAATGATAAAAACTACCTTAGGGATAACAGCATTATTTTAAATA
5840_SCrBO TACGATAAAGTAAATCGATTTTATAAGAAATGATAAAAACTACCTTAGGGATAACAGCATTATTTTAAATA
5841_SCrBO TACGATAAAGTAAATCGATTTTATAAGAAATGATAAAAACTACCTTAGGGATAACAGCATTATTTTAAATA
5842_SCrBO TACGATAAAGTAAATCGATTTTATAAGAAATGATAAAAACTACCTTAGGGATAACAGCATTATTTTAAATA
5843_SCrBO TACGATAAAGTAAATCGATTTTATAAGAAATGATAAAAACTACCTTAGGGATAACAGCATTATTTTAAATA
5844_SCrBO TACGATAAAGTAAATCGATTTTATAAGAAATGATAAAAACTACCTTAGGGATAACAGCATTATTTTAAATA
3955_BenCo TACGATAAAGTAAATCGATTTTATAAGAAATGATAAAAACTACCTTAGGGATAACAGCATTATTTTAAATA
3962_BarMe TACGATAAAGTAAATCGATTTTATAAGAAATGATAAAAACTACCTTAGGGATAACAGCATTATTTTAAATA
4118_CarCa TACGATAAAGTAAATCGATTTTATAAGAAATGATAAAAACTACCTTAGGGATAACAGCATTATTTTAAATA
4119_CarCa TACGATAAAGTAAATCGATTTTATAAGAAATGATAAAAACTACCTTAGGGATAACAGCATTATTTTAAATA
4117_CarCa TACGATAAAGTAAATCGATTTTATAAGAAATGATAAAAACTACCTTAGGGATAACAGCATTATTTTAAATA
4266_CarCa TACGATAAAGTAAATCGATTTTATAAGAAATGATAAAAACTACCTTAGGGATAACAGCATTATTTTAAATA
BamazoAM_1 TACGATAAAGTAAATCGATTTTATAAGAAATGATAAAAACTACCTTAGGGATAACAGCATTATTTTAAATA
3964_BarMe TACGATAAAGTAAATCGATTTTATAAGAAATGATAAAAACTACCTTAGGGATAACAGCATTATTTTAAATA
5839_SCrBO TACGATAAAGTAAATCGATTTTATAAGAAATGATAAAAACTACCTTAGGGATAACAGCATTATTTTAAATA
3958_BenCo TACGATAAAGTAAATCGATTTTATAAGAAATGATAAAAACTACCTTAGGGATAACAGCATTATTTTAAATA
3965_BarMe TACGATAAAGTAAATCGATTTTATAAGAAATGATAAAAACTACCTTAGGGATAACAGCATTATTTTAAATA
5508_LetCO TACGATAAAGTAAATCGATTTTATAAGAAATGATAAAAACTACCTTAGGGATAACAGCATTATTTTAAATA
3128_BenCo TACGATAAAGTAAATCGATTTTATAAGAAATGATAAAAACTACCTTAGGGATAACAGCATTATTTTAAATA
3961_BarMe TACGATAAAGTAAATCGATTTTATAAGAAATGATAAAAACTACCTTAGGGATAACAGCATTATTTTAAATA
5503_LetCO TACGATAAAGTAAATCGATTTTATAAGAAATGATAAAAACTACCTTAGGGATAACAGCATTATTTTAAATA
5506_LetCO TACGATAAAGTAAATCGATTTTATAAGAAATGATAAAAACTACCTTAGGGATAACAGCATTATTTTAAATA
4265_CarCa TACGATAAAGTAAATCGATTTTATAAGAAATGATAAAAACTACCTTAGGGATAACAGCATTATTTTAAATA
4115_CarCa TACGATAAAGTAAATCGATTTTATAAGAAATGATAAAAACTACCTTAGGGATAACAGCATTATTTTAAATA
BamazoAM_2 TACGATAAAGTAAATCGATTTTATAAGAAATGATAAAAACTACCTTAGGGATAACAGCATTATTTTAAATA
5515_LetCO TACGATAAAGTAAATCGATTTTATAAGAAATGATAAAAACTACCTTAGGGATAACAGCATTATTTTAAATA
4262_CarCa TACGATAAAGTAAATCGATTTTATAAGAAATGATAAAAACTACCTTAGGGATAACAGCATTATTTTAAATA
5507_LetCO TACGATAAAGTAAATCGATTTTATAAGAAATGATAAAAACTACCTTAGGGATAACAGCATTATTTTAAATA
3959_BenCo TACGATAAAGTAAATCGATTTTATAAGAAATGATAAAAACTACCTTAGGGATAACAGCATTATTTTAAATA
3957_BenCo TACGATAAAGTAAATCGATTTTATAAGAAATGATAAAAACTACCTTAGGGATAACAGCATTATTTTAAATA
5510_LetCO TACGATAAAGTAAATCGATTTTATAAGAAATGATAAAAACTACCTTAGGGATAACAGCATTATTTTAAATA
3956_BenCo TACGATAAAGTAAATCGATTTTATAAGAAATGATAAAAACTACCTTAGGGATAACAGCATTATTTTAAATA
3960_BarMe TACGATAAAGTAAATCGATTTTATAAGAAATGATAAAAACTACCTTAGGGATAACAGCATTATTTTAAATA
5501_LetCO TACGATAAAGTAAATCGATTTTATAAGAAATGATAAAAACTACCTTAGGGATAACAGCATTATTTTAAATA
5514_LetCO TACGATAAAGTAAATCGATTTTATAAGAAATGATAAAAACTACCTTAGGGATAACAGCATTATTTTAAATA
BedisoAM_1 TACGATAAATTAATCGATTTTATAAGAAATAAAAACTACCTTAGGGATAACAGCATTATTTTAAATA
BpronaAM_1 TACGATAAATAAATCGATTTTATAAGAAATAAAAACTACCTTAGGGATAACAGCATTATTTTAAATA
BpronaAM_2 TACGATAAATAAATCGATTTTATAAGAAATAAAAACTACCTTAGGGATAACAGCATTATTTTAAATA
BstramAM_1 TACGAATTAATTAATCGATTTTATAAGAAATAAAAACTACCTTAGGGATAACAGCATTATTTTAAATA
BstramAM_2 TACGAATTAATTAATCGATTTTATAAGAAATAAAAACTACCTTAGGGATAACAGCATTATTTTAAATA
BkuhniAM_1 TACGAATTTAATTAATCGATTTTATAAGAAATAAAAACTACCTTAGGGATAACAGCATTATTTTAAATA
BkuhniAM_2 TACGAATTTAATTAATCGATTTTATAAGAAATAAAAACTACCTTAGGGATAACAGCATTATTTTAAATA
BinterAM_1 TACGAATTAATTAATCGATTTTATAAGAAATAAAAACTACCTTAGGGATAACAGCATTATTTTAAATA
BtenagAM_1 TATAATTAATTTAATCGATTTTATAAGAAATAAAAACTACCTTAGGGATAACAGCATTATTTTAAATA
BtenagAM_2 TATAATTAATTTAATCGATTTTATAAGAAATAAAAACTACCTTAGGGATAACAGCATTATTTTAAATA
BoccidAM_1 TACTATTTAATAATCGATTTTATAAGAAATAAAAACTACCTTAGGGATAACAGCATTATTTTAAATA
BtguaiAM_1 TACTATTTAATAATCGATTTTATAAGAAATAAAAACTACCTTAGGGATAACAGCATTATTTTAAATA
BglabrAM_1 TATAGTGTGATAAATCGATTTTATAAGAAATAAAAACTACCTTAGGGATAACAGCATTATTTTAAATA

BalexafAF_2 TGATTGTGACCTCGATGTTGGACTAGGAACTTTATGGCTAGCCGTCATAAAAAGATTTGTTCTGTTTCGAAC
 BsudanAF_1 TGATTGTGACCTCGATGTTGGACTAGGAACTTTATGGCTAGCCGTCATAAAAAGATTTGTTCTGTTTCGAAC
 BsudanAF_2 TGATTGTGACCTCGATGTTGGACTAGGAACTTTATGGCTAGCCGTCATAAAAAGATTTGTTCTGTTTCGAAC
 BsmithAF_1 TGATTGTGACCTCGATGTTGGACTAGGAACTTTATGGCTAGCCGTCATAAAAAGATTTGTTCTGTTTCGAAC
 BchoanAF_1 TGATTGTGACCTCGATGTTGGACTAGGAACTTTATGGCTAGCCGTCATAAAAAGATTTGTTCTGTTTCGAAC

780
|....|...
 Htrivolis AATATTATCCTAC
 BschrAM_1 AATATTATCCTAC
 BhelepAM_1 AATTATATCCTAC
 BperegAM_1 AATTATATCCTAC
 BperegAM_2 AATTTATCCTAC
 BoligoAM_1 AATTATATCCTAC
 BobstrAM_1 AATTTAATCCTAC
 BobstrAM_2 AATTTAATCCTAC
 BtemasAM_1 AATTTAATCCTAC
 5838_SCrBO AATTATATCCTAC
 5840_SCrBO AATTTATCCTAC
 5841_SCrBO AATTTATCCTAC
 5842_SCrBO AATTTATCCTAC
 5843_SCrBO AATTTATCCTAC
 5844_SCrBO AATTTATCCTAC
 3955_BenCo AATTTATCCTAC
 3962_BarMe AATTTATCCTAC
 4118_CarCa AATTTATCCTAC
 4119_CarCa AATTTATCCTAC
 4117_CarCa AATTTATCCTAC
 4266_CarCa AATTTATCCTAC
 BamazoAM_1 AATTTATCCTAC
 3964_BarMe AATTTATCCTAC
 5839_SCrBO AATTTATCCTAC
 3958_BenCo AATTTATCCTAC
 3965_BarMe AATTTATCCTAC
 5508_LetCO AATTTATCCTAC
 3128_BenCo AATTTATCCTAC
 3961_BarMe AATTTATCCTAC
 5503_LetCO AATTTATCCTAC
 5506_LetCO AATTTATCCTAC
 4265_CarCa AATTTATCCTAC
 4115_CarCa AATTTATCCTAC
 BamazoAM_2 AATTTATCCTAC
 5515_LetCO AATTTATCCTAC
 4262_CarCa AATTTATCCTAC
 5507_LetCO AATTTATCCTAC
 3959_BenCo AATTTATCCTAC
 3957_BenCo AATTTATCCTAC
 5510_LetCO AATTTATCCTAC
 3956_BenCo AATTTATCCTAC
 3960_BarMe AATTTATCCTAC
 5501_LetCO AATTTATCCTAC
 5514_LetCO AATTTATCCTAC
 BedisoAM_1 AATTTATCCTAC
 BpronaAM_1 AATTTATCCTAC
 BpronaAM_2 AATTTATCCTAC
 BstramAM_1 AATTAATCCTAC
 BstramAM_2 AATTTATCCTAC
 BkuhniAM_1 AATTTATCCTAC
 BkuhniAM_2 AATTTATCCTAC
 BinterAM_1 AATTAATCCTAC
 BtenagAM_1 AATATTATCCTAC
 BtenagAM_2 AATATTATCCTAC
 BoccidAM_1 AATATTATCCTAC
 BtguaiAM_1 AATATTATCCTAC
 BglabrAM_1 AATATTATCCTAC
 BglabrAM_2 AATATTATCCTAC
 BcamerAF_1 AATTTATCCTAC
 BcamerAF_2 AATTTATCCTAC
 BpfeffAF_1 AATTTATCCTAC
 BpfeffAF_2 AATTTATCCTAC
 BstanlAF_1 AATTTATCCTAC
 BalexafAF_1 AATTTATCCTAC
 BalexafAF_2 AATTTATCCTAC
 BsudanAF_1 AATTTATCCTAC
 BsudanAF_2 AATTTATCCTAC
 BsmithAF_1 AATTTATCCTAC
 BchoanAF_1 AATTTATCCTAC

1. Paraense WL. Self and cross-fertilization in *Australorbis glabratus*. Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz. 1955;53:285-291.
2. Vidigal T, Caldeira RL, Simpson AJG, Carvalho OS. Further studies on the molecular systematics of *Biomphalaria* snails from Brazil. Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz. 2000;95(1):57-66.
3. Caldeira RL, Teodoro TM, Gomes MFB & Carvalho OS. Investigação da presença de *Biomphalaria cousini* no Brasil: estudos preliminares. Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz. 2009;(submetido).
4. Paraense WL. "*Biomphalaria amazonica*" and "*B. cousini*", two new species of neotropical planorbid molluscs. Rev Bras Biol. 1966 Aug;26(2):115-26.
5. Vidigal T, Kissinger JC, Caldeira RL, Pires ECR, Monteiro E, Simpson AJG, et al. Phylogenetic relationships among Brazilian *Biomphalaria* species (Mollusca : Planorbidae) based upon analysis of ribosomal ITS2 sequences. Parasitology. 2000;121:611-20.
6. DeJong RJ, Morgan JAT, Paraense WL, Pointier JP, Amarista M, Ayeh-Kumi PFK, 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. 2001;18(12):2225-39.
7. Estrada VE, Velasquez LE, Caldeira RL, Bejarano EE, Rojas W, Carvalho OS. Phylogenetics of South American *Biomphalaria* and description of a new species (Gastropoda : Planorbidae). Journal of Molluscan Studies. 2006;72:221-8.
8. Paraense WL. Estado atual da sistemática dos planorbídeos brasileiros. Arquivo Do Museu Nacional Do Rio de Janeiro. 1975;55:105-128
9. Carvalho OS, Jannotti-Passos LK, Caldeira RL. Importância epidemiológica e biologia molecular aplicada ao estudo dos moluscos do gênero *Biomphalaria*. 311-345p. In Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HL. *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Ed: Fiocruz, Rio de Janeiro. 2008;1124pp.
10. Corrêa LR, Paraense WL. Susceptibility of *Biomphalaria amazonica* to infection with two strains of *Schistosoma mansoni*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1971 Nov-Dec;13(6):387-90.
11. Paraense WL, Corrêa LR. Susceptibility of *Biomphalaria peregrina* from Brazil and Ecuador to two strains of *Schistosoma mansoni*. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1973;15: 127-130.
12. Paraense WL. Fauna planorbídica do Brasil. 213-239p. In Lacaz CS, Baruzzi RG, Siqueira Jr W. Introdução à geografia médica do Brasil. Ed: Edgard Blucher, Universidade de São Paulo. 1972; 568pp.
13. Barbosa FS, Oliver L. Studies on the snail vectors of *Bilharziasis mansoni* in northestearn Brazil. Bull World Health Organ. 1958;18:895-908.
14. Pieri OS, Favre TC. Diapausa em *Biomphalaria glabrata*. 421-432p. In Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HL. *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Ed: Fiocruz, Rio de Janeiro. 2008;1124pp.

15. Paraense WL. The sites of cross and self-fertilization in planorbid snails. Rev Brasil Biol. 1976;36: 535-539.
16. Paraense WL. A genetic approach to the systematics of planorbid molluscs. Evolution. 1956;10: 403-407.
17. Paraense WL, Pereira O, Pinto DB. Um aspecto da ecologia do *Australorbis glabratus* que favorece a reinfestação dos criadouros. Rev Serv Esp Saúde Públ. 1955;7: 573-581.
18. Vidigal T, Neto ED, Carvalho OD, Simpson AJG. *Biomphalaria glabrata* - Extensive genetic-variation in Brazilian isolates revealed by random amplified polymorphic DNA analysis. Experimental Parasitology. 1994;79(2):187-94.
19. Caldeira RL, Vidigal T, Simpson AJG, Carvalho OS. Genetic variability in Brazilian populations of *Biomphalaria straminea* complex detected by simple sequence repeat anchored polymerase chain reaction amplification. Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz. 2001;96(4):535-44.
20. Campos YR, Carvalho OS, Goveia CO, Romanha AJ. Genetic variability of the main intermediate host of the *Schistosoma mansoni* in Brazil, *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda : Planorbidae) assessed by SSR-PCR. Acta Tropica. 2002;83(1):19-27.
21. Carvalho OS, Jannotti-Passos LK, Mendonça CLFG, Cardoso PCM, Caldeira RL. Moluscos de Importância Médica no Brasil. Ed: Fiocruz/Centro de Pesquisas René Rachou, Belo Horizonte. 2005; 52pp.
22. Paraense WL, Corrêa LR. Variation in susceptibility of populations of *Australorbis glabratus* to a strain of *Schistosoma mansoni*. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1963;5:15-22.
23. Paraense WL, Correa LR. Differential susceptibility of *Biomphalaria tenagophila* populations to infection with a strain of *Schistosoma mansoni*. Journal of Parasitology. 1978;64(5):822-826.
24. Malek EA, Rouquayrol MZ. Experimental-infection with *Schistosoma mansoni* of *Biomphalaria straminea* from different parts of the northeast of Brazil. Revista Do Instituto De Medicina Tropical De Sao Paulo. 1986;28(3):160-165.
25. Richards CS. Genetics of a molluscan vector of schistosomiasis. Nature. 1970;227(5260):806-810.
26. Richards CS. Influence of snail age on genetic variations in susceptibility of *Biomphalaria glabrata* for infection with *Schistosoma mansoni*. Malacologia. 1984;25(2):493-502.
27. Richards CS, Shade PC. The genetic-variation of compatibility in *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni*. Journal of Parasitology. 1987;73(6):1146-1151.
28. Paraense WL, Corrêa LR. Further experiments on susceptibility of *Biomphalaria amazonica* to *Schistosoma mansoni*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1985 Jul-Sep;80(3):259-62.
29. Fernandez MA, Thiengo SC. Susceptibility of *Biomphalaria amazonica* and *Biomphalaria occidentalis* from Manso Dam, Mato Grosso, Brazil to infection with

- three strains of *Schistosoma mansoni*. Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz. 2006 Sep;101 Suppl 1:235-7.
30. Newton WL. The inheritance of susceptibility to infection with *Schistosoma mansoni* in *Australorbis glabratus*. Experimental Parasitology. 1953;2(3):242-57.
31. Richards CS. *Schistosoma mansoni* - susceptibility reversal with age in snail host *Biomphalaria glabrata*. Experimental Parasitology. 1977;42(1):165-8.
32. Richards CS, Merritt JW. Genetic factors in susceptibility of juvenile *Biomphalaria glabrata* to *Schistosoma mansoni* infection. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 1972;21(4):425-434.
33. Santana JV, Magalhães LA, Rangel HÁ. Seleção de linhagem de *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria tenagophila* visando maior susceptibilidade ao *Schistosoma mansoni*. Rev. Saúde Pública. 1978;12: 67-77.
34. Lewis FA, Richards CS, Knight M, Cooper LA, Clark B. *Schistosoma mansoni* - analysis of an unusual infection phenotype in the intermediate host snail *Biomphalaria glabrata*. Experimental Parasitology. 1993;77(3):349-61.
35. Zanotti-Magalhães EM, Magalhães LA, Carvalho JF. Relationship between the pathogenicity of *Schistosoma mansoni* in mice and the susceptibility of the vector mollusc. I. cercariae infectivity and worm burden. Rev. Saúde públ. São Paulo. 1971;25(5): 359 - 366.
36. Boissier J, Morand S, Mone H. A review of performance and pathogenicity of male and female *Schistosoma mansoni* during the life-cycle. Parasitology. 1999;119:447-54.
37. Zavodna M, Sandland GJ, Minchella DJ. Effects of intermediate host genetic background on parasite transmission dynamics: A case study using *Schistosoma mansoni*. Experimental Parasitology. 2008;120(1):57-61.
38. Souza CP, Jannotti-Passos LK, Freitas JR. Degree of host-parasite compatibility between *Schistosoma mansoni* and their intermediate molluscan hosts in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1995;90: 5 -10.
39. Paraense WL, Correa LR. A potential vector of *Schistosoma mansoni* in Uruguay. Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz. 1989;84(3):281-8.
40. Paraense WL, Corrêa LR. Probable extension of schistosomiasis mansoni to southern most Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1987;82: 577.
41. Deslandes N. Técnica de dissecação e exame de planorbídeos. Rev Serv Espec Saúde Públ. 1951;4:371-382.
42. Paraense WL, Deslandes N. A redescription of *Taphius andecolus*. Rev Brasil Biol. 1957;16:149-158.
43. Paraense WL, Deslandes N. Observations on *Taphius havanensis* (Pulmonata: Planorbidae). Rev Bras Biol. 1958a;18:87-91.
44. Paraense WL, Deslandes N. Observations on *Taphius pronus* (Martens, 1873) (Pulmonata: Planorbidae). Rev Bras Biol. 1958b;18:367-373.

45. Paraense WL. *Biomphalaria occidentalis* spn from South America (Mollusca: Basommatophora: Pulmonata). Mem Inst Oswaldo Cruz. 1981;76:199-211.
46. Paraense WL. *Biomphalaria tenagophila guaibensis* sspn from southern Brazil and Uruguay (Pulmonata:Planorbidae) I: Morphology. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1984;79:465-469.
47. Paraense WL. *Biomphalaria kuhniana* (Clessin, 1883), planorbid mollusc from South America. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1988;83:1-12.
48. Paraense WL. *Biomphalaria obstructa* (Morelet, 1849) - A study of topotypic specimens (Mollusca, Pulmonata, Planorbidae). Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz. 1990;85(4):391-9.
49. Spatz L, Vidigal T, Caldeira RL, Neto ED, Cappa SMG, Carvalho OS. 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. 1999;65:143-9.
50. Paraense WL. Neotropical Planorbid snails with apertural lamellae .1. *Biomphalaria helophila* (Orbigny, 1835). Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz. 1996;91(2):177-86.
51. Paraense WL. Shell versus anatomy in planorbid systematics. I: *Australorbis glabratus*. Rev Brasil Biol. 1961;21:163-170.
52. Monis PT. The importance of systematics in parasitological research. Int J Parasitol. 1999;29:381-388.
53. Paraense WL. A survey of planorbid molluscs in the Amazonian region of Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1983;78:343-361.
54. Dorval ME, da Silva RP. *Biomphalaria amazonica* Paraense, 1966 in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil (Mollusca, Pulmonata, Planorbidae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 1990 1990 Jan-Mar;85(1):117-8.
55. Pointier JP, Paraense WL, Dejong RJ, Loker ES, Bargues MD, Mas-Coma S. A potential snail host of schistosomiasis in Bolivia: *Biomphalaria amazonica* Paraense, 1966. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002 Sep;97(6):793-6.
56. Velasquez LE, Caldeira RL, Estrada V, Carvalho OS. Morphological and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism characterization of *Biomphalaria kuhniana* and *Biomphalaria amazonica* from Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002 Oct;97(7):997-1004.
57. Hillis DM. Molecular versus morphological approaches to Systematics. Annual Review of Ecology and Systematics. 1987;18:23-42.
58. Long EO, Dawid IB. Repeated genes in Eukaryotes. Annual Review of Biochemistry. 1980;49:727-64.
59. Hillis DM, Dixon MT. Ribosomal DNA - Molecular evolution and phylogenetic inference. Quarterly Review of Biology. 1991;66:411-53.

60. Conole JC, Chilton NB, Jarvis T, Gasser RB. Mutation scanning analysis of microsatellite variability in the second internal transcribed spacer (precursor ribosomal RNA) for three species of *Metastrongylus* (Strongylida: Metastrongyloidea). *Parasitology*. 2001;122:195-206.
61. Prasad PK, Tandon V, Biswal DK, Goswami LM, Chatterjee A. Molecular identification of the Indian liver fluke, *Fasciola* (Trematoda : Fasciolidae) based on the ribosomal internal transcribed spacer regions. *Parasitology Research*. 2008;103(6):1247-55.
62. Prasad PK, Tandon V, Chatterjee A, Bandyopadhyay S. PCR-based determination of internal transcribed spacer (ITS) regions of ribosomal DNA of giant intestinal fluke, *Fasciolopsis buski* (Lankester, 1857) Looss, 1899. *Parasitology Research*. 2007;101:1581-7.
63. Ki JS, Kim IC, Lee JS. Comparative analysis of nuclear ribosomal DNA from the moon jelly *Aurelia* sp. (Cnidaria: Scyphozoa) with characterizations of the 18S, 28S genes, and the intergenic spacer (IGS). *Hydrobiologia*. 2009;616:229-39.
64. Jeewon R, Liew ECY, Hyde KD. Molecular systematics of the Amphisphaeriaceae based on cladistic analyses of partial LSU rDNA gene sequences. *Mycological Research*. 2003;107:1392-402.
65. Jorgensen MF, Murray S, Daugbjerg N. Amphidinium revisited. I. Redefinition of Amphidinium (Dinophyceae) based on cladistic and molecular phylogenetic analyses (vol 40, pg 351, 2004). *Journal of Phycology*. 2004;40(6):1181-.
66. Grande C, Templado J, Cervera JL, Zardoya R. Molecular phylogeny of Euthyneura (Mollusca : Gastropoda). *Molecular Biology and Evolution*. 2004;21(2):303-13.
67. Van Herwerden L, Blair D, Agatsuma T. Intra- and interindividual variation in ITS1 of *Paragonimus westermani* (Trematoda : Digenea) and related species: Implications for phylogenetic studies. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 1999;12(1):67-73.
68. Alvarez I, Wendel JF. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2003;29(3):417-34.
69. Blaxter ML, De Ley P, Garey JR, Liu LX, Scheldeman P, Vierstraete A, et al. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature*. 1998;392(6671):71-5.
70. Gasser RB, Newton SE. Genomic and genetic research on bursate nematodes: significance, implications and prospects. *International Journal for Parasitology*. 2000;30(4):509-34.
71. Blouin MS. Molecular prospecting for cryptic species of nematodes: mitochondrial DNA versus internal transcribed spacer. *Int J Parasitology*. 2002;32:527-531.
72. Hung GC, Chilton NB, Beveridge I, Gasser RB. A molecular systematic framework for equine strongyles based on ribosomal DNA sequence data. *International Journal for Parasitology*. 2000;30(1):95-103.

73. Susurluk IA, Toprak U. Molecular identification of three entomopathogenic nematodes from Turkey by PCR-RFLP of the ITS regions. *Phytoparasitica*. 2006;34(1):17-20.
74. Gomez-Moliner BJ, Cabria MT, Rubines J, Garin I, Madeira MJ, Elejalde A, et al. PCR-RFLP identification of mustelid species: European mink (*Mustela lutreola*), American mink (*M. vison*) and polecat (*M. putorius*) by analysis of excremental DNA. *Journal of Zoology*. 2004;262:311-6.
75. Miao M, Warren A, Song WB, Wang S, Shang HM, Chen ZG. Analysis of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) region of scuticociliates and related taxa (Ciliophora, Oligohymenophorea) to infer their evolution and phylogeny. *Protist*. 2008;159(4):519-33.
76. Zapata MA, Cienfuegos AV, Quiros OI, Quinones ML, Luckhart S, Correa MM. Discrimination of seven *Anopheles* species from San Pedro De Uraba, Antioquia, Colombia, by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of its sequences. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2007;77(1):67-72.
77. Mergulhao A, da Silva MV, Figueiredo MDB, Burity HA, Maia LC. Characterisation and identification of arbuscular mycorrhizal fungi species by PCR/RFLP analysis of the rDNA internal transcribed spacer (ITS). *Annals of Microbiology*. 2008;58(2):341-4.
78. Nakamura M, Suprpta DN, Iwai H. Differentiation of pathogenic and nonpathogenic isolates of *Geotrichum candidum* sensu Suprpta et al. (1995) on citrus fruit based on PCR-RFLP analysis of rDNA ITS and PCR using specific primers designed in polygalacturonase genes. *Mycoscience*. 2008;49(2):155-8.
79. Osakabe M, Kotsubo Y, Tajima R, Hinomoto N. Restriction fragment length polymorphism catalog for molecular identification of Japanese *Tetranychus spider mites* (Acari:Tetranychidae). *Journal of Economic Entomology*. 2008;101(4):1167-75.
80. Sukrong S, Zhu S, Ruangrunsi N, Phadungcharoen T, Palanuvej C, Komatsu K. Molecular analysis of the genus *Mitragyna* existing in Thailand based on rDNA ITS sequences and its application to identify a narcotic species: *Mitragyna speciosa*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2007;30(7):1284-8.
81. Remigio EA, Blair D. Relationships among problematic North American stagnicoline snails (Pulmonata: Lymnaeidae) reinvestigated using nuclear ribosomal RNA internal transcribed spacer sequences. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie*. 1997;75(9):1540-5.
82. Caldeira RL, Vidigal T, Paulinelli ST, Simpson AJG, Carvalho OS. Molecular identification of similar species of the genus *Biomphalaria* (Mollusca : Planorbidae) determined by a polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 1998;93:219-25.
83. Caldeira RL, Vidigal T, Matinella L, Simpson AJG, Carvalho OS. Identification of planorbids from Venezuela by polymerase chain reaction amplification and restriction fragment length polymorphism of internal transcriber spacer of the RNA ribosomal gene. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 2000;95(2):171-7.

84. Raahauge P, Kristensen TK. A comparison of *Bulinus africanus* group species (Planorbidae; Gastropoda) by use of the internal transcribed spacer 1 region combined by morphological and anatomical characters. *Acta Tropica*. 2000;75(1):85-94.
85. Carvalho OS, Caldeira RL, Simpson AJG, Vidigal T. Genetic variability and molecular identification of Brazilian *Biomphalaria* species (Mollusca : Planorbidae). *Parasitology*. 2001;123:S197-S209.
86. Carvalho OS, Cardoso PCM, Lira PM, Rumi A, Roche A, Berne E, et al. The use of the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism technique associated with the classical morphology for characterization of *Lymnaea columella*, *L. viatrix*, and *L. diaphana* (Mollusca : Lymnaeidae). *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 2004;99(5):503-7.
87. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing, Inc, New York . 2002;1616pp.
88. Simon C, Frati F, Becknbach A, Crespi B, Liu H, Flook P. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 1994;87:651-701.
89. Nikulina EA. Taxonomy and ribosomal DNA-based phylogeny of the *Electra* crustulenta species group (Bryozoa: Cheilostomata) with revision of Borg's varieties and description of *Electra moskvikvendi* sp nov from the Western Baltic Sea. *Organisms Diversity & Evolution*. [Article]. 2008;8(3):215-29.
90. Thum RA, Harrison RG. Deep genetic divergences among morphologically similar and parapatric *Skistodiaptomus* (Copepoda: Calanoida: Diaptomidae) challenge the hypothesis of Pleistocene speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*. [Article]. 2009 Jan;96(1):150-65.
91. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle-cell anemia. *Science*. 1985;230(4732):1350-4.
92. Hennig, W. *Phylogenetic Systematics*. (English Translation). Urbana: University of Illinois Press. 1966;284pp.
93. de Queiroz K. Ernst Mayr and the modern concept of species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102:6600-7.
94. Mayr E. *Systematics and the Origin of Species from the viewpoint of a zoologist*. Columbia University Press. New York. 1942;334 pp.
95. Fitch WM, Ayala FJ. Tempo and mode in evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994;91:6717- 6720.
96. Sokal RR, Crovello TJ. Biological species concept - A critical evaluation. *American Naturalist*. 1970;104(936):127pp.
97. Dobzhansky, T. *Genetics of the Evolutionary Process*. New York: Columbia University Press. 1970;505pp.

98. Andersson L. The driving force: species concepts and ecology. *Taxon*. 1990;39(3):375-382.
99. Rosen DE. Fishes from the uplands and intermontane basins of Guatemala. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 1979;162:267-376.
100. Paraense WL, Deslandes N. *Australorbis nigricans* as the transmitter of schistosomiasis in Santos state of Sao Paulo. *Rev Bras Malariol D. Trop.* 1956;3:235-245.
101. Moritz C & Hillis DM. Molecular systematics: Context and controversies. 1-16p. In: Hillis DM, Moritz C, Mable BK. *Molecular Systematics* 2nd Ed: Sinauer Associates Sunderland, Massachusetts. 1996;655pp.
102. Swofford DL, Olsen GJ, Waddell PJ, Hillis M. Phylogenetic Inference. 407-514p. In Hillis DM, Mortiz C, Mable BK. *Molecular Systematics* 2nd Ed: Sinauer Associates Sunderland, Massachusetts. 1996;655 pp.
103. Pereira SL, Miyaki CY, Russo CAM. Reconstrução filogenética: métodos probabilísticos. 117-129p. In: Matioli SR. *Biologia Molecular e Evolução*. Ed: Holos, , Ribeirão Preto, SP. 2001; 202pp.
104. Schneider H. Métodos de análise filogenética: um guia prático. 3rd Ed: Holos, e Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, SP. 2007; 200pp.
105. Saitou N, Nei M. The Neighbor-Joining method - A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 1987;4(4):406-25.
106. Li WH. *Molecular evolution*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, MA. 1997;487pp.
107. Felsenstein J. Evolutionary trees from DNA-sequences - A Maximum-Likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*. 1981;17(6):368-76.
108. Lyons-Weiler J, Hoelzer GA, Tausch RJ. Optimal outgroup analysis. *Biological Journal of the Linnean Society*. 1998;64(4):493-511.
109. Rota-Stabelli O, Telford MJ. A multi criterion approach for the selection of optimal outgroups in phylogeny: Recovering some support for Mandibulata over Myriochelata using mitogenomics. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2008;48(1):103-11.
110. Puslednik L, Serb JM. Molecular phylogenetics of the Pectinidae (Mollusca : Bivalvia) and effect of increased taxon sampling and outgroup selection on tree topology. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2008;48(3):1178-88.
111. Graur D, Li W-H. *Fundamentals of molecular evolution*. 2nd Ed: Sinauer Associates, Inc. Sunderland, MA. 2000;439pp.
112. Felsenstein J. Confidence-limits on phylogenies - An approach using the bootstrap. *Evolution*. 1985;39(4):783-91.
113. Hillis DM, Bull JJ. An empirical-test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology*. 1993;42(2):182-92.

114. Kane RA, Rollinson D. Repetitive sequences in the ribosomal DNA internal transcribed spacer of *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma intercalatum* and *Schistosoma mattheei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1994;63(1):153-6.
115. Palumbi SR. Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. 205–248p. In: Hillis DM, Moritz C, Mable BK. *Molecular Systematics* 2nd Ed: Sinauer Associates Sunderland, Massachusetts. 1996;655pp.
116. Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research*. 1998;8(3):175-85.
117. Ewing B, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Research*. 1998;8(3):186-94.
118. Gordon D, Abajian C, Green P. Consed: A graphical tool for sequence finishing. *Genome Research*. 1998;8(3):195-202.
119. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*. 2004;32(5):1792-7.
120. Capella-Gutiérrez S, Jose M, Silla-Martínez, Gabaldón T. TrimAl: a tool for automatic alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. 2008;(Submitted).
121. Posada D, Crandall KA. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*. 1998;14(9):817-8.
122. Pellegrino J, Katz N. Experimental chemotherapy of Schistosomiasis mansoni. *Adv Parasitol*. 1968;6:233-290.
123. Jannotti-Passos LK, Caldeira RL, Carvalho OS. Técnicas utilizadas no estudo dos moluscos do gênero *Biomphalaria* e na manutenção do ciclo de *Schistosoma mansoni*. 531-544p. In Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HL. *Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar*. Ed: Fiocruz, Rio de Janeiro. 2008;1124pp.
124. Paraense WL, Pointier JP, Delay B, Pernot AF, Incani RN, Balzan C, et al. *Biomphalaria prona* (Gastropoda, Planorbidae) - A morphological and biochemical-study. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 1992;87(2):171-9.
125. Paraense WL, Deslandes N. Reproductive isolation between *Australorbis glabratus* and *A. nigricans*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 1955;53:325-327.
126. Barbosa FS, Coelho MV, Carneiro E. Cross-breeding of *Australorbis glabratus* and *Biomphalaria boissyi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1956;50:296-7.
127. Barbosa FS, Barbosa I, Carneiro E. The anatomy of *Tropicorbis philippianus* (Dunker) and its relationships to the Brazilian planorbidae (Molusca, Pulmonata). *J Conchyliologie*. 1958;93:180-184.
128. Mello-Silva CC, Gault CE, da Costa VA, Barbosa FS. Possible hybridization of Brazilian planorbid snails and its importance in population dynamics. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 1998;93:227-32.
129. Barbosa FS. The renal ridge a disputed feature of anatomy of planorbid snail *Australorbis tenagophilus*. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1964;6:64-70.

130. Barbosa FS. Possible competitive displacement and evidence of hybridization between two Brazilian species of planorbid snails. *Malacologia*. 1973;14:401-408.