

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

NATANAEL BEZERRA MONROE

**ABORDAGEM FILOGEOGRÁFICA PARA *Biomphalaria glabrata* E
Biomphalaria straminea EM BIOMAS DO ESTADO DO MARANHÃO**

São Luis
2016

NATANAEL BEZERRA MONROE

ABORDAGEM FILOGEOGRÁFICA PARA *Biomphalaria glabrata* E *Biomphalaria straminea* EM BIOMAS DO ESTADO DO MARANHÃO

Trabalho apresentado ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Prof.^a Dr.^a Ana Lúcia Abreu Silva
Orientadora

Prof.^a Dr.^a Lígia Tchaicka
Co-orientadora

São Luis
2016

Monroe, Natanael Bezerra.

Abordagem filogeográfica para *Biomphalaria glabrata* E *Biomphalaria straminea* em biomas do Estado do Maranhão/Natanael Bezerra Monroe – São Luís, 2016.

60f

Dissertação (Mestrado) – Curso de Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Ana Lúcia Abreu Silva

1.PCR-RFLP. 2.Filogenética. 3.Esquistossomose. I.Título

NATANAEL BEZERRA MONROE

ABORDAGEM FILOGEOGRÁFICA PARA *Biomphalaria glabrata* E *Biomphalaria straminea* EM BIOMAS DO ESTADO DO MARANHÃO

Trabalho apresentado ao programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Ana Lúcia Abreu Silva – UEMA/ Orientadora

Prof^a Dr^a Lígia Tchaicka – UEMA/ Co-Orientadora

Prof^a. Dr^a. Selma Patrícia Diniz Cantanhede – UEMA

Prof. Dr. Luis Fernando Carvalho Costa – UFMA

Aos meus queridos mestres

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, *“porque nele vivemos, e nos movemos, e existimos...”*.
Obrigado meu Pai, pelo dom da vida.

Agradeço à minha família, meus pais e irmão, sempre presentes me apoiando e fortalecendo meu ânimo. À Thércia, minha noiva e companheira de lutas, sejam elas acadêmicas ou pessoais.

Agradeço às minhas orientadoras, professora Ana Lúcia e Lígia Tchaicka pela oportunidade que me deram de crescer um pouco mais na minha profissão. Vocês são exemplo pra mim.

Agradeço à UEMA e ao povo maranhense que a sustenta, pela educação de qualidade e pelos almoços “grátis” no RU. Será uma honra e uma missão retribuir o que recebi.

Agradeço ao Mestrado em Ciência Animal pelo suporte, especialmente à Fran (gostaria de saber onde ela encontra espaço para guardar todos os papéis que precisamos entregar). Ao “Seu” Agnaldo, pela parceria nas viagens de coleta.

Agradeço ainda ao Curso de Medicina Veterinária e ao Laboratório de Patologia Molecular, minha “segunda casa” nesses últimos dois anos, pelo apoio estrutural.

À Capes e a FAPEMA, pela bolsa de estudos.

Por fim, agradeço aos meu colegas e amigos de trabalho. Juntos, dividimos vitórias e quedas, momentos de alegria e tristeza. Porém, não desistimos mesmo diante de um gel sem bandas. Desejo que todos vocês sejam felizes nessa vida, e não há felicidade na vida sem Cristo no coração.

“Se vi mais longe, foi por estar de pé sobre ombros de gigantes”

Isaac Newton

RESUMO

Os caramujos pulmonados de água doce do gênero *Biomphalaria* Preston, 1910 são conhecidos por sua importância epidemiológica como hospedeiros intermediários do parasito *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 agente causador da esquistossomose. Dez espécies e uma subespécie deste gênero são encontradas no Brasil. No Maranhão, estão presentes dois hospedeiros naturais, *Biomphalaria glabrata* e *B. straminea*. O estudo destes hospedeiros é importante para a interpretação de seus papéis na transmissão da esquistossomose. Conhecimentos sobre a história e estrutura populacional de vetores, auxiliam a compreensão da história e estrutura populacional dos parasitos. Nesse ponto, a Filogeografia é ferramenta essencial. Assim, este trabalho propõe estudar a ocorrência dos padrões filogeográficos de populações das espécies *B. glabrata* e *B. straminea* em diferentes biomas do Estado Maranhão, bem como obter perfis espécie-específicos através da PCR-RFLP e comparar os dados morfológicos das espécies com os dados moleculares. Os caramujos foram coletados em pontos de amostragem na Amazônia, Litoral e Cerrado Maranhense. A identificação morfológica foi feita conforme a técnica descrita por Paraense (1975, 1988). Para a extração de DNA seguiu-se o protocolo de Medrano et al (1990). Três marcadores distintos foram amplificados: COI, 16S e ITS. As sequências de DNA obtidas foram corrigidas no programa MEGA 6.0 e alinhadas. Índices de diversidade foram calculados através do Programa DNA sp v.5. As redes de haplótipos foram construídas através do método de vetores medianos no Network 4.6.1.0. Para o Estado do Maranhão, confirma-se através da PCR-RFLP a presença de *B. glabrata* e *B. straminea*. Destaca-se a presença de *B. straminea* em cidades do Estado ainda não documentadas. As redes haplotípicas construídas para os genes COI e 16S de *B. glabrata* sugerem que seu estabelecimento na Amazônia é recente e que houve contribuição de migrantes de populações do Litoral. Para *B. straminea*, estes marcadores revelaram haplótipos exclusivos e compartilhados para o Litoral, Amazônia e Cerrado. Apesar de genes bastante diferenciados nos biomas, há indicação de fluxo gênico entre populações do Litoral e Cerrado. A região ITS revelou alta diversidade genética nas populações amazônicas de *B. straminea*. Supõem-se que, a quantidade de sequências dos marcadores moleculares para *B. straminea* em cada bioma tenha influenciado na detecção dessa diversidade. O gênero *Biomphalaria* é considerado excelente modelo para estudos biogeográficos e dispersão passiva.

Palavras-chaves: PCR-RFLP, Filogenética, Esquistossomose.

ABSTRACT

The pulmonados freshwater snails of the genus *Biomphalaria* Preston, 1910 are known for their epidemiological significance as intermediate hosts of the parasite *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 causative agent of schistosomiasis. Ten species and one subspecies of this genus are found in Brazil. In Maranhão, are present *Biomphalaria glabrata* and *B. straminea*. The study of these hosts is important for the interpretation of their roles in the transmission of schistosomiasis. Knowledge about the history and population structure of vectors, assist the understanding of history and population structure of parasites. At that point, Phylogeography is an essential tool. Thus, this paper proposes to study the occurrence of Phylogeographic patterns of populations of species *B. glabrata* and *B. straminea* in different biomes of Maranhão State, as well as get specific species profiles by PCR-RFLP and compare the morphological data of species with molecular data. The snails were collected in sampling points in the Amazon, Cerrado and Maranhão Coastline. Morphological identification was made according to the technique described by Para (1975, 1988). For DNA extraction protocol followed Medrano et al. (1990). Three distinct markers were amplified: COI, 16S and ITS. The DNA sequences obtained were corrected in MEGA 6.0 program and aligned. Diversity indices were calculated through the Program DNAsp v. 5. The haplotypes were built through the method of median vectors in the Network 4.6.1.0. To the State of Maranhão, is confirmed by PCR-RFLP the presence of *B. glabrata* and *B. straminea*. The presence of *B. straminea* in cities in the State have not yet documented. Haplotypic networks built for the genes COI and 16S of *B. glabrata* suggest that its establishment in the Amazon is recent and that there was no contribution of migrants to coastal populations. To *B. straminea*, these markers revealed unique haplotypes and shared to the coast, the Amazon and Cerrado. Despite very different genes in biomes, is no indication of gene flow between populations of coast and bushland. The ITS region revealed high genetic diversity in Amazonian populations of *B. straminea*. Assume that the amount of sequences of molecular markers for *B. straminea* in each biome has influenced in the detection of this diversity. The genus *Biomphalaria* is considered excellent model for biogeographic studies and passive dispersal.

Key-words: PCR-RFLP, Phylogenetic, Schistosomiasis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Espécime de *Biomphalaria* e (à esquerda) desova. Fonte: Carvalho et al, 2005).....
- Figura 2.** Mapa do Estado do Maranhão sinalizando as cidades onde foram realizadas as coletas dos caramujos. A – São Luís, B – São Bento, C – Arari, D – Pedreiras, E – Trizidela do Vale, F – Caxias e G – Carolina. Fonte: O Autor.....
- Figura 3.** Representação esquemática dos perfis de restrição da região ITS obtidos com a enzima DdeI para dez espécies e uma subespécie de *Biomphalaria* do Brasil. Fonte: Vidigal et al (2000).....
- Figura 4.** Concha de *B. glabrata* (A) e concha de *B. straminea* (B). Fonte: O Autor e Cantanhede (2014).....
- Figura 5.** Morfologia interna de *B. glabrata* (A) destacando a crista renal (Cr) e, morfologia interna de *B. straminea* (B) com ênfase no enrugamento vaginal (Ev). Fonte: O Autor.....
- Figura 6.** Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio mostrando perfis de restrição de *B. straminea* (A) e *B. glabrata* (B). O peso molecular está descrito à esquerda das imagens. Fonte: Ferreira (2015).....
- Figura 7.** Níveis de saturação dos marcadores moleculares (A) COI (611pb), (B) 16S (305pb) e (C) ITS (466pb) calculados no programa DAMBE.....
- Figura 8.** Árvore filogenética do gene COI construída no programa MEGA 6.0 através de Máxima Verossimilhança, pelo método Tamura-3-parâmetros (G + I) com intervalo de confiança de 95% e 1000 replicações. Fonte: O Autor.....
- Figura 9.** Árvore filogenética do gene 16S construída no programa MEGA 6.0 através de Máxima Verossimilhança, pelo método Tamura-3-parâmetros (G + I) com intervalo de confiança de 95% e 1000 replicações. Fonte: O Autor.....
- Figura 10.** Redes de haplótipos dos genes COI (A) e 16S (B) de *B. glabrata* construídas no NETWORK através do cálculo de vetores medianos (“median joining”). Fonte: O Autor.....

Figura 11. Redes de haplótipos dos genes 16S (A) e COI (B) de *B. straminea* construídas no NETWORK através do cálculo de vetores medianos (“median joining”). Fonte: O Autor.....

Figura 12. Percentagens de Variância Molecular: (A) 16S e (B) COI em *B. straminea*; (C) 16S e (D) COI em *B. glabrata*. Fonte: O Autor.....

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espécies encontradas por localidade e sequências obtidas para cada marcador. Fonte: O Autor.....

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	
REVISÃO DE LITERATURA	
O GÊNERO <i>Biomphalaria</i>	
A FILOGEOGRAFIA.....	
OBJETIVOS	
METODOLOGIA	
COLETA DE EXEMPLARES.....	
IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR.....	
ANÁLISE BASEADA EM FRAGMENTOS DO GENOMA.....	
RESULTADOS E DISCUSSÃO	
IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR.....	
DIVERSIDADE GENÉTICA.....	
ANÁLISES FILOGENÉTICAS.....	
REDES HAPLOTÍPICAS.....	
CONCLUSÃO	
REFERÊNCIAS.....	

INTRODUÇÃO

O gênero *Biomphalaria* Preston, 1910 é bem conhecido por apresentar espécies de importância epidemiológica, que atuam como hospedeiras intermediárias do trematódeo digenético parasito humano *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 (DEJONG et al, 2001). Este parasito é um dos agentes causadores da esquistossomose, infectando milhões de pessoas, a maioria na África, porém, importantes focos da doença são encontrados na região Neotropical (CHITSULO et al, 2000), incluindo áreas endêmicas no Brasil, entre elas regiões do estado do Maranhão.

Dez espécies e uma subespécie de *Biomphalaria* são reconhecidas no Brasil: *Biomphalaria glabrata* Say, 1818, *Biomphalaria tenagophila* Orbigny, 1835, *Biomphalaria straminea* Dunker, 1848, *Biomphalaria peregrina* Orbigny, 1835, *Biomphalaria kuhniiana* Clessin, 1883, *Biomphalaria schrammi* Crosse, 1864, *Biomphalaria amazonica* Paraense, 1966, *Biomphalaria oligoza* Paraense, 1974, *Biomphalaria intermedia* Paraense e Deslandes, 1962, *Biomphalaria occidentalis* Paraense, 1981 e *Biomphalaria tenagophila guaibensis* Paraense, 1984, mas apenas *B. glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila* são encontradas naturalmente infectadas por *S. mansoni* Sambon, 1907 (PARAENSE & CORRÊA, 1973).

No Maranhão, dados recentes confirmam a presença de *B. glabrata*, *B. straminea* (CANTANHEDE et al, 2014). Esse registro, baseado em análises morfológicas, define as áreas específicas de ocorrência de cada uma dessas espécies nos municípios inseridos na microrregião da Baixada Maranhense, bem como a presença de espécimes de *B. glabrata* infectados por *S. mansoni*.

Esses caramujos apresentam duas características biológicas fundamentais para a preservação e a expansão das espécies e populações, em ambientes sujeitos as perturbações ambientais: 1) são hermafroditas simultâneos e se reproduzem tanto por

fecundação cruzada, quanto por autofecundação; e 2) em situações de seca, dessecam, mantendo-se vivos, em estágio fisiológico vegetativo, preservando-se até a próxima estação úmida (BRASIL, 2008).

O estudo destes hospedeiros é importante para a interpretação de seus papéis na transmissão da esquistossomose e assim orientar medidas de controle, adequadas a cada localidade, direcionadas aos caramujos. Conhecimentos sobre a história e estrutura populacional de vetores, podem auxiliar na compreensão da história e estrutura populacional dos parasitos e assim, enriquecer as informações sobre a transmissão das doenças por eles veiculadas. Nesse ponto, a Filogeografia apresenta-se como ferramenta essencial (AVISE et al, 1987).

A Filogeografia é a área da ciência que investiga a distribuição geográfica de linhagens genealógicas dentro de uma espécie (ou comparando espécies próximas), e procura explicar quais são os principais fatores ou barreiras ambientais que influenciaram na distribuição da diversidade encontrada nas diferentes populações (AVISE et al, 1987).

Verificar a diversidade de espécies do gênero *Biomphalaria* em diferentes biomas do Maranhão é, dessa forma, importante para a reconstrução de sua história filogeográfica e, não apenas isto, mas também pode gerar informações valiosas para estudos epidemiológicos relacionados à esquistossomose.

Outro aspecto relevante em se tratando de estudos com vetores de doenças é a identificação taxonômica dos mesmos. De certo, o correto registro dos planorbídeos do gênero *Biomphalaria* permite conhecer a fauna de moluscos de determinada região e detectar espécies presentes em áreas de transmissão da esquistossomose (TEODORO, 2009).

Os levantamentos de moluscos hospedeiros de parasitoses, tradicionalmente, utilizam metodologias de identificação baseadas na morfologia externa e/ou interna dos animais. Essa técnica, no entanto, é dificultada algumas vezes pelo tamanho reduzido dos moluscos e pelo processo de fixação inadequado (CARVALHO et al, 2007), além da grande variação intraespecífica nas características usadas para classificá-los (VIDIGAL et al, 2000).

Deve-se levar em consideração ainda a estreita semelhança existente entre algumas espécies desse gênero, que culminou no agrupamento de algumas espécies em dois complexos: (1) complexo *B. straminea* (constituído por *B. straminea*, *B. intermedia* e *B. kuhniiana*); e (2) complexo *B. tenagophila* (formado por *B. tenagophila*, *B. t. guibensis* e *B. occidentalis*) (CARVALHO et al, 2007).

Em decorrência dessa diversidade morfológica e biológica do gênero *Biomphalaria* técnicas alternativas foram introduzidas para auxiliar a identificação destas espécies e melhor compreender a variabilidade genética entre elas (TEODORO, 2009).

Uma técnica bastante confiável para a separação das espécies de *Biomphalaria* presentes no Brasil é a PCR-RFLP (reação em cadeia da polimerase e análise do polimorfismo de fragmentos de restrição). Essa técnica baseia-se na amplificação das regiões espaçadoras transcritas internas (ITS1 + 5.8S + ITS2) do gene codificador do RNA ribossomal e na subsequente digestão desse fragmento com enzimas que cortam a fita dupla da molécula de DNA em sítios específicos de reconhecimento, denominados sítios de restrição (CARVALHO et al, 2007).

Para o presente estudo, o uso dessa técnica é importante tanto para o correto agrupamento das espécies nas abordagens filogenética e filogeográfica, quanto para

complementar e fortalecer os dados sobre a distribuição das espécies do gênero no Estado do Maranhão.

REVISÃO DE LITERATURA

O GÊNERO *Biomphalaria*

As espécies do gênero *Biomphalaria* Preston, 1910 (Figura 1) estão inseridas no filo Mollusca, classe Gastropoda, subclasse Pulmonata, ordem Basommatophora e família Planorbidae. Possuem concha discoidal em espiral plana, com os lados aproximadamente paralelos, orifícios genitais localizados do lado esquerdo do corpo e um par de tentáculos finos e longos.



Figura 1. Espécime de *Biomphalaria* e (à direita) desova. Fonte: Carvalho et al, 2005.

O termo *Biomphalaria* tem origem nos radicais latim *bis* (duas vezes) e grego *omphalos* (umbigo), em referência ao aprofundamento do giro central dos dois lados da concha. Os giros das conchas apresentam estrias de crescimento e sua abertura varia entre as espécies (PARAENSE, 1975).

Os caramujos têm sua origem documentada na era Jurássica, os quais resistiram a grandes mudanças ambientais, o que resultou no desenvolvimento de mecanismos de sobrevivência como autofecundação, diapausa, estivação e alta prolificidade (JANNOTTI-PASSOS et al, 2010).

Para o gênero, existem atualmente 37 espécies e uma subespécie (CARVALHO et al, 2008; TEODORO et al, 2010) restritas às regiões tropicais e subtropicais (DEJONG et al 2001), distribuídas pelas Américas, África e Oriente Médio (COLLADO et al, 2011).

O gênero *Biomphalaria* é conhecido por sua importância epidemiológica, apresentando espécies hospedeiras dos agentes causadores da esquistossomose, dentre os quais, o *Schistosoma mansoni*, responsável pela doença no continente americano (TEODORO et al, 2010).

Devido a intrincada interação evolutiva parasito-hospedeiro, os trematodeos são altamente específicos para seus vetores moluscos e os miracídios de *S. mansoni* só desenvolvem-se com sucesso em representantes do gênero *Biomphalaria* (VAN DER KNAAP; LOKER, 1990).

Entre as espécies encontradas na América do Sul, apenas *B. glabrata*, *B. straminea*, *B. tenagophila* e *B. prona* foram registradas com infecção natural por *S. mansoni*, enquanto, *B. amazonica*, *B. peregrina*, *B. havanensis* Pfeiffer, 1839, *B. helophila* Orbigny, 1835, *B. sericea* Dunker, 1848 e *B. cousini* Paraense, 1966 são consideradas hospedeiras em potencial (CORRÊA & PARAENSE, 1971; PARAENSE; CORRÊA, 1973 RICHARDS, 1963; MICHELSON, 1976; YONG et al, 2001; TEODORO et al, 2010).

Geralmente, os caramujos preferem água estagnada ou em movimento lento, apresentando elevado grau de tolerância à variação da temperatura de seu habitat (FAO, 2013). No entanto, o aumento da concentração salina inviabiliza sua sobrevivência. Dessa forma, apesar de tolerarem ampla gama de condições ambientais, sua distribuição local pode ser irregular, formando, por vezes, agregados bem delimitados ao longo de curtas distâncias, à margem de lagos ou rios (TAYLOR; FRANCIS, 1994).

Vários trabalhos com enfoque neste grupo foram e têm sido realizado em diversas áreas do conhecimento científico. Dentre estes, serão aqui destacadas algumas destas pesquisas nas diferentes áreas.

A diferenciação das espécies de moluscos do gênero *Biomphalaria* é geralmente realizada através de análises morfológicas, entretanto, a plasticidade fenotípica do grupo, dificulta em muitos casos sua realização (PARAENSE, 1955; TEODORO et al, 2010). Assim, a implementação dessa tarefa com as ferramentas moleculares tem sido útil. Podemos destacar a PCR-RFLP, o uso de microssatélites, a genotipagem e o sequenciamento. Dentre estas, a mais utilizada tem sido a PCR-RFLP.

Teodoro et al (2011), verificaram a ocorrência de hibridismo entre *B. cousini* e *B. amazonica* através da visualização dos perfis de restrição obtidos por PCR-RFLP, sendo ainda constatado que os híbridos são suscetíveis a certas linhagens de *S. mansoni* em laboratório. Tian-Bi et al (2013) realizaram uma pesquisa de contraste entre a distribuição da variação fenotípica e genética (microssatélites) entre populações do principal vetor africano de *S. mansoni*, *B. pfeifferi* Krauss, 1848. Os resultados obtidos mostram que a diferenciação fenotípica média entre as populações é inferior a diferenciação genética média. Pepe et al (2009), utilizaram as abordagens morfológica e molecular (PCR-RFLP) para identificar espécies de *Biomphalaria* coletadas em doze municípios do Rio Grande do Sul. Os espécimes encontrados foram identificados como: *B. tenagophila*, *B. oligoza* e *B. peregrina* e estas ainda, foram submetidas à infecção por *S. mansoni* e apresentaram-se refratárias.

Ainda nesta linha, Vidigal et al (2004), com base em dados de sequenciamento da região ITS2 para *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea* que revelaram sítios de restrição, realizaram trabalho visando selecionar a enzima mais eficiente na diferenciação molecular (sítios de restrição específicos) das espécies vetores

da esquistossomose no Brasil. A pesquisa revelou que a amplificação da região ITS2 e sua clivagem com a enzima HpaII é ferramenta molecular auxiliar à identificação morfológica desses moluscos, bem como em estudos filogenéticos de planorbídeos neotropicais. Os mesmos pesquisadores realizaram trabalho semelhante (Vidigal et al, 2002), entretanto, utilizando a região COI do mDNA (DNA mitocondrial), mostrando que esse gene possui padrões polimórficos capazes de diferenciar as três espécies (*B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*) quando submetido à clivagem com a enzima RsaI.

Outro trabalho a ser mencionado é o de Caldeira et al (2000) que, utilizando análises morfológicas e de PCR-RFLP (regiões ITS1 e 2) identificaram espécimes de *Biomphalaria* coletados na Venezuela, sendo a enzima DdeI considerada a produtora de perfis mais distinguíveis. Os caramujos foram identificados com *B. glabrata*, *B. prona* e *B. kuhniiana*. Os mesmos pesquisadores realizaram trabalho anterior (Caldeira et al, 1998), utilizando a mesmas ferramentas para diferenciar as espécies do complexo *B. straminea* (*B. straminea*, *B. kuhniiana*, *B. intermedia*) e *B. peregrina*, e ainda, identificar a distância genética entre elas. A mesma enzima (DdeI) produziu os melhores perfis de restrição.

No âmbito da Ecoepidemiologia da esquistossomose podemos citar inicialmente dois trabalhos atuais no Estado do Maranhão. Cantanhede et al (2014), realizaram trabalho com moluscos presentes na Microrregião da Baixada Maranhense, uma região endêmica para esquistossomose. Dentre as espécies coletadas estavam *B. glabrata*, *B. straminea* e *B. schrammi*. O trabalho apresenta os municípios de ocorrência dessas espécies, bem como espécimes de *B. glabrata* infectados por larvas de *S. mansoni*, alertando a importância de estudos epidemiológicos nessa área. Dorlam's et al (2013) realizaram inquérito malacológico em uma região da periferia de São Luís do

Maranhão, coletando espécimes de *B. glabrata* e *B. straminea*. Verificaram que, espécimes de *B. glabrata* estavam infectados por *S. mansoni*, sendo o índice de positividade negativamente correlato à temperatura máxima. O trabalho infere a relação entre a infraestrutura da área e a existência dos caramujos transmissores, fatores essenciais à propagação da esquistossomose

Rowel et al (2014), documentaram a dinâmica populacional de *Biomphalaria* e infecções naturais associadas com *S. mansoni* em dois lagos africanos (Lago Albert e Lago Vitória), além do registro de fatores físico-químicos. As espécies foram morfológicamente identificadas como *B. sudanica* Martens, 1870, *B. pfeifferi* e *B. stanleyi* Smith, 1888 no Lago Albert e *B. sudanica*, *B. pfeifferi* e *B. choanomphala* Martens, 1879 no Lago Vitória, sendo todas estas infectadas ou por *S. mansoni*, ou por cercarias não infecciosas, ou ainda, por ambas. O estudo revelou fatores físico-químicos associados à infecção dos caramujos e os pesquisadores chamam a atenção ao alto risco de transmissão de esquistossomose nos lagos, sugerindo maior esforço na redução da contaminação ambiental e melhorias do saneamento da água local e higiene.

Medeiros et al (2002), apresentam a distribuição dos moluscos límnicos presentes em Niterói, Rio de Janeiro, assim como dos casos de esquistossomose relatados no período de 1995 a 2000. Neste período, foram pesquisadas todas as coleções hídricas favoráveis à ocorrência de moluscos límnicos e, dentre as espécies encontradas estavam *B. straminea* e *B. tenagophila* que, embora não estivessem infectados por *S. mansoni*, eliminaram outros tipos de cercarias.

Giovanelli et al (2001), estudaram a abundância e infecção de *B. glabrata* por *S. mansoni* no Estado do Rio de Janeiro. Os resultados mostraram abundância populacional do molusco bastante variável ao longo do tempo e dos ambientes amostrados, sendo que a maioria dos pontos de coleta apresentou correlação negativa

com a pluviosidade. Outro dado importante foi que na estação seca foram encontrados mais moluscos infectados, possivelmente devido à diminuição de volume dos corpos d' água, gerando maior probabilidade do encontro do parasito com seu vetor.

Barbosa et al (2000), realizaram pesquisa em ecoepidemiologia da esquistossomose na ilha de Itamaracá, em Pernambuco e verificaram a presença de criadouros em 1km de extensão da praia e a presença exclusiva de *B. glabrata*. Os resultados mostraram a variação mensal da densidade populacional de moluscos e das taxas de infecção correlacionados com sazonalidade e tipo de criadouro. Os pesquisadores destacaram a importância desse novo perfil epidemiológico da esquistossomose em Pernambuco, relacionando o modo de ocupação daquele espaço com o estabelecimento de sítios de transmissão ativa.

Quanto a distribuição e diversidade do gênero *Biomphalaria*, podemos destacar o trabalho de Tuan (2009) no qual a pesquisadora verificou a diversidade e abundância do grupo em microrregiões localizadas no Médio Paranapanema, em São Paulo. Os dados confirmam a predominância de *Biomphalaria glabrata* e de *Biomphalaria tenagophila* em diferentes municípios. Foram estimados os índices de diversidade e dominância de Simpson, que evidenciaram distribuição variada, possivelmente associada com o substrato aquático onde vivem os caramujos.

Teles et al (2005) estudaram a distribuição geográfica das espécies dos caramujos transmissores da esquistossomose no Estado de São Paulo. A distribuição geográfica de *B. glabrata* e *B. tenagophila* apresentou criadouros muito agregados, sendo que, para *B. tenagophila* a maior compactação coincidiu em regiões com elevada urbanização e, para *B. straminea*, em criadouros das áreas de drenagem de todas as bacias hidrográficas. Sugeriu-se que, devido à facilidade de contato parasito/hospedeiro,

os agregados de criadouros de *B. glabrata* e *B. tenagophila* sejam propícios à preservação das áreas endêmicas de *S. mansoni* em São Paulo.

Na área da genética expõem-se o trabalho de Standley et al (2014), avaliaram a estrutura genética populacional de *B. choanomphala* no Lago Vitória, na África. Foram examinados níveis de estruturação populacional em vinte e nove populações localizadas em área endêmica para a esquistossomose. Vários níveis de diversidade genética foram encontrados determinados geograficamente e baixos níveis de endogamia nas populações. Os dados são consistentes com influência de infecção por *S. mansoni* na estrutura da população, bem como outros fatores, como habitat e alterações histórico-demográficas.

Jannotti-Passos et al (2010) realizaram o sequenciamento de todo mtDNA (DNA mitocondrial) de *B. tenagophila*, um vetor importante da esquistossomose no Brasil. Este trabalho é fundamental para estudos moleculares tanto dessa espécie, quanto do gênero.

Estrada et al (2006) investigaram a filogenia de *Biomphalaria* na América do Sul e descreveram uma nova espécie para o gênero, *B. edisoni*. Eles utilizaram sequências dos espaçadores internos ITS1 e 2 do rDNA (DNA ribossomal) nuclear de *B. edisoni* e de quatorze espécies neotrópicas, sendo esta, agrupada em um clado monofilético. As distâncias genéticas dentro deste grupo monofilético foram suficiente para se considerar *B. edisoni* uma espécie, além do apoio da morfologia e da topologia da árvore filogenética.

DeJong et al (2004) apresentaram o sequenciamento completo do mtDNA de *B. glabrata*, o hospedeiro intermediário mais suscetível parasito humano *S. mansoni*. Este feito tem facilitado investigações moleculares sobre a biologia do gênero *Biomphalaria*, bem como as interações destes vetores com o *S. mansoni*.

Vidigal et al (2004) analisaram sequências dos espaçadores internos ITS1 e 2 no complexo *B. tenagophila* (*B. tenagophila*, *B. occidentalis* e *B. t. guaibensis*). As árvores filogenéticas produzidas foram, em sua maioria, concordantes com a morfologia e com dados moleculares obtidos por PCR-RFLP. Os resultados dão suporte à proposta de que *B. tenagophila* representa, de fato, um complexo de espécies.

A FILOGEOGRAFIA

A Filogeografia é a área da biologia evolutiva que estuda os padrões intra e interespecíficos de distribuição da variabilidade genética, relacionando as linhagens dos genes com suas disposições geográficas e, procura explicar quais são os fatores ou barreiras que promoveram a configuração atual da diversidade genética nas populações (AVISE et al, 1987; AVISE, 2000; 2009).

Essa estrutura pode ser muito complexa, como no caso de espécies que habitam regiões de forte atividade tecto-vulcânica, e ainda, de menor complexidade, como em populações com altas taxas de migração ou cujo isolamento é relativamente recente, em termos geológicos (p. ex. última glaciação) (DOMINGUEZ; VÁSQUEZ, 2009).

A determinação dessa distribuição geográfica é essencial, pois os limites de sua ocorrência podem ser utilizados em programas de conservação e manejo (FILHO, 2008). Ademais, essas informações evidenciam a dinâmica das populações e as condições ambientais que influenciam a sobrevivência, reprodução e dispersão das espécies (CAICEDO; SCHAAL, 2004; BROWN; LOMILINO, 2006)

Para a análise e interpretação da distribuição das linhagens, geralmente são necessárias informações ou abordagens provenientes da genética molecular, genética de

populações, etologia, demografia, análise filogenética, paleontologia, geologia, e geografia histórica (AVISE, 2000).

A Filogeografia dá uma nova visão do papel do fluxo gênico na estruturação genética populacional e proporciona a compreensão histórica de eventos de fluxo gênico, permitindo diferenciar entre padrões originados de fluxo gênico atual ou ancestral e testar hipóteses evolutivas (SCHAAL et al, 1998; WEISS; FERRAND, 2007), o que a leva a ser considerada uma ponte entre a microevolução e a macroevolução (DOMINGUEZ; VÁSQUEZ, 2009).

Por esse motivo, o estudo da distribuição geográfica de linhagens genealógicas tem sido amplamente utilizado para descrever eventos, tais como: fragmentação habitat ou a expansão da área de distribuição das espécies e populações, eventos de migração, vicariância, extinção de linhagens genéticas e outros processos que afetam a estrutura das populações, causando especiação no âmbito espacial e temporal (HARDY et al, 2002).

Para o gênero *Biomphalaria*, pode-se mencionar a pesquisa de Collado et al (2014) que analisaram a genética, morfologia e os traços históricos de variação nos caramujos na região de Parinacota, Caquena e Colpa, nos Planaltos Andinos. A análise filogeográfica revelou linhagens distintas entre Parinacota e as duas outras regiões, Caquena e Colpa. A morfometria da concha mostrou que os moluscos de Parinacota eram maiores, tanto em condições naturais quanto laboratoriais.

Esses mesmos autores também mostraram a influência do fenômeno de vicariância em *Biomphalaria* na região sul dos Planaltos Andinos. Eles obtiveram sequências do gene COI de 17 populações e a filogenia revelou que os espécimes dessas populações formam um grupo irmão com *B. peregrina*, sendo que, neste clado, recuperou-se quatro linhagens principais bem apoiadas e consistentes com a distribuição

geográfica na região. O padrão de ramificação das sequências sugere que na diversificação destes caramujos, eventos de vicariância ocorridos no Pleistoceno sobrepõem-se a fenômenos de dispersão.

DeJong et al (2003), realizaram um estudo filogeográfico de *B. glabrata* e *B. pfeifferi*, as duas espécies vetores de maior importância no ciclo da esquistossomose no Novo e Velho mundo, respectivamente, usando parte da sequência do gene 16S e a sequência do gene ND1, ambos, do genoma mitocondrial e a região ITS1 do genoma nuclear e verificaram a existência de 6 linhagens bem diferenciadas de *B. glabrata* na América do Sul e que *B. pfeifferi* é uma espécie bem recente na África.

Mavárez et al (2002a) por meio da análise de parte da sequência do gene mitocondrial 16S e da região espaçadora interna ITS2 do gene ribossomal nuclear, de *B. glabrata* na América do Sul e pequenas Antilhas identificaram variabilidade significativa entre as 17 populações estudadas e que as populações brasileiras eram as mais diversificadas, por isso apresentavam-se como basais para as demais. A análise da diversidade genética de populações de *B. glabrata* na Bacia do Lago Valência realizada por esses mesmo autores, utilizando sete loci de microssatélites mostrou que essa espécie realiza essencialmente fertilização cruzada, com pequenas taxas de autofecundação entre as populações. Além disso, detectaram considerável variação genética, promovida provavelmente pela dinâmica no fluxo gênico entre as populações.

DeJong et al (2001), utilizaram sequências do gene ribossomal mitocondrial 16S e das regiões espaçadoras ITS1 e ITS2 do gene ribossomal nuclear e verificaram a influência da relação evolutiva e da biogeografia das espécies deste gênero no papel como hospedeiras do *S. mansoni* e reuniram estas em dois grandes clados: o Neotropical e o Africano, sendo o último, o clado que contém as espécies mais suscetíveis ao parasito *S. mansoni*, dentre elas, *B. glabrata*.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

- Investigar os padrões filogeográficos de populações de *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria straminea* obtidas em diferentes biomas do Estado Maranhão.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar sequências do DNA mitocondrial (COI, 16S) e nuclear (ITS) de *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria straminea* obtidas no Maranhão, com as sequências depositadas em bancos de dados internacionais (GENBANK, BOLD SYSTEMS);
- Inferir padrões filogeográficos para as populações de *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria straminea*;
- Obter perfis espécie-específicos;
- Comparar os dados morfológicos e dados moleculares das espécies citadas.

METODOLOGIA

CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

O Estado do Maranhão possui área superficial da ordem de 331.983,29 km², sendo o oitavo maior Estado brasileiro e o segundo do Nordeste em extensão territorial (IBGE, 2002). Está localizado entre os paralelos 1°01' e 10°21' sul e os meridianos 41° 48' e 48°50' oeste. Ao norte limita-se com o Oceano Atlântico (639,5 km), ao sul e sudoeste com o Tocantins (1.060 km), a oeste com o Pará (798 km) e a leste e sudeste limita-se com o Piauí (1.365 km) (MARANHÃO, 2011).

Os caramujos foram coletados em pontos de amostragem na região urbana dos municípios de Arari e São Bento (Baixada Maranhense); São Luís (Litoral Maranhense); Caxias, Pedreiras, Trizidela do Vale e Carolina (Cerrado Maranhense) (Figura 2).

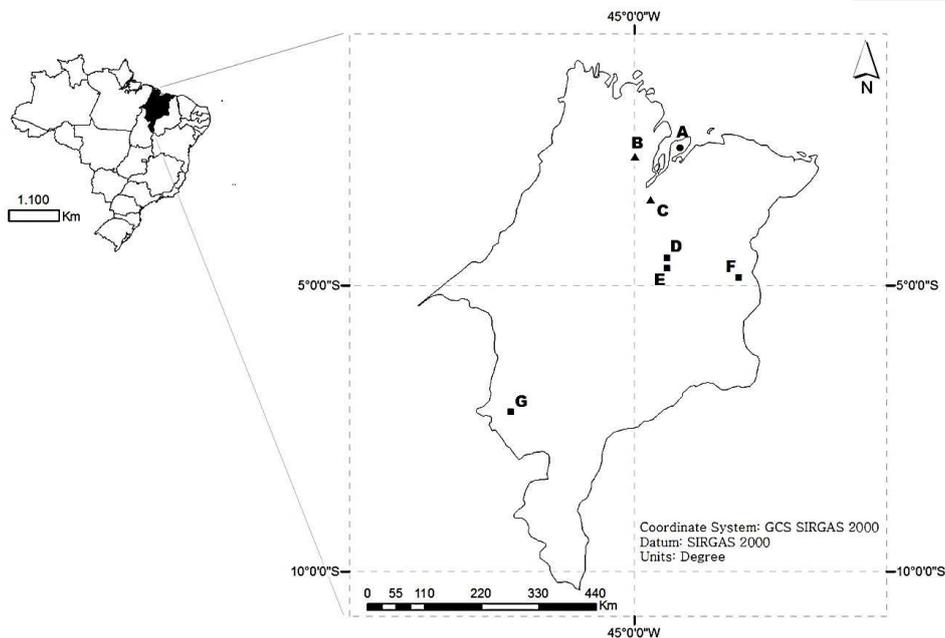


Figura 2. Mapa do Estado do Maranhão sinalizando as cidades onde foram realizadas as coletas dos caramujos. A – São Luís, B – São Bento, C – Arari, D – Pedreiras, E – Trizidela do Vale, F – Caxias e G – Carolina. Fonte: O autor.

COLETA DOS EXEMPLARES DE MOLUSCOS

A coleta foi realizada por meio de busca ativa em coleções hídricas (córregos, riachos e valas) propícias ao estabelecimento de populações de caramujos. Os espécimes foram coletados, com auxílio de pinças metálicas e/ou concha, utilizando um período mínimo de 30 minutos para a captura. Após a coleta, os caramujos foram transportados para o laboratório. No laboratório, os caramujos foram acondicionados em bacias de plástico, com água desclorada e alimentados com alface.

IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

Para a remoção da parte mole da concha, os espécimes foram colocados em solução anestésica de hypnol (pentobartibal sódico a 0,01%) e após um período mínimo de 4 horas foram submetidos a choque térmico, mergulhando-os em água aquecida à 70° C e em seguida, em água à temperatura ambiente.

De cada indivíduo foi coletado um fragmento da região cefalopodal para extração de DNA, PCR e sequenciamento. Este material foi tombado na Coleção da Fauna Maranhense (COFAUMA/UEMA), sob o registro BSP 643 a BSP 799. As demais partes do corpo foram fixadas em solução de Railliet-Henry, conforme técnica descrita por Fernandez et al (2008) para dissecação dos espécimes.

Identificação morfológica – A identificação morfológica dos moluscos foi feita por meio da análise dos caracteres da concha, dos sistemas excretor e reprodutor, conforme técnica descrita por Paraense (1975, 1988).

Produção e avaliação da PCR-RFLP com enzima DdeI – Amplificados da região nuclear ITS foram submetidos a PCR-RFLP com clivagem através da enzima

DdeI, iniciada com 3h 50min a 37°C e 20 minutos a 55°C. A avaliação das clivagens foi realizada em gel de agarose a 2% e fotografada em aparelho fotodocumentador, sendo o padrão de bandas comparado com o proposto por Vidigal et al, 2000 (Figura 3).

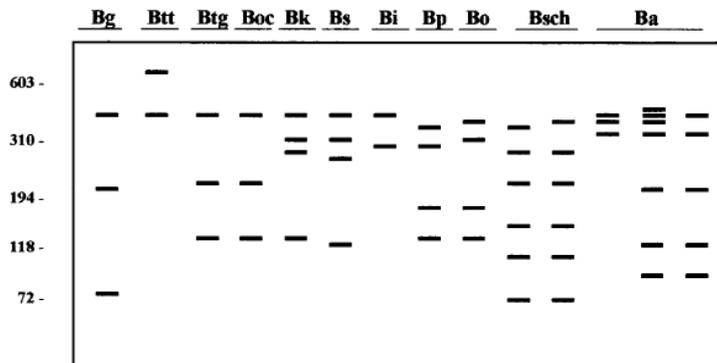


Figura 3. Representação esquemática dos perfis de restrição da região ITS obtidos com a enzima *DdeI* para dez espécies e uma subespécie de *Biomphalaria* do Brasil. As letras são abreviações de cada espécie: *Biomphalaria glabrata* (Bg); *B. t. tenagophila* (Btt); *B. occidentalis* (Boc); *B. t. guaibensis* (Btg), *B. straminea* (Bs); *B. intermedia* (Bi); *B. kuhniiana* (Bk); *B. peregrina* (Bp); *B. oligoza* (Bo); *B. schrammi* (Bsch) e *B. amazonica* (Ba). A marcação de tamanho molecular é mostrada ao lado do gel. Fonte: Vidigal et al (2000).

ANÁLISE BASEADA EM FRAGMENTOS DO GENOMA

Extração de DNA - Os tecidos foram preservados em etanol absoluto, a -4°C. Para a extração de DNA seguiu-se o protocolo de Medrano et al (1990), sendo posteriormente o material avaliado quanto à qualidade e quantidade por eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio.

Amplificação de DNA - Três marcadores distintos foram amplificados, um nuclear e dois mitocondriais. A região nuclear de interesse compreendeu os espaçadores transcritos internos 1 e 2 e a porção 5.8S do gene ribossomal (ITS1+5.8S+ITS2). Para o DNA mitocondrial, foram utilizados os genes citocromo C oxidase subunidade I (COI) e o gene ribossomal 16S.

Para ITS1+5.8S+ITS2 foram utilizados os primers descritos por Kane & Rollinson (1994) ETTS2 (5'-TAA CAA GGT TTC CGT AGG TGA A-3') e ETTS1 (5'-TGC TTA AGT TCA GCG GGT-3'). Para o gene COI, os primers universais descritos

por Folmer et al (1994) LCO (5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3') e HCO (5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3'). Para o gene 16S, utilizou-se os primers universais propostos por Palumbi (1996) 16Sar (5'-GCC TGT TTA TCA AAA ACA T-3') e 16Sbr (5'-CTC CGG TTT GAA CTC AGA TC-3').

As Reações de PCR tiveram um volume final de 10 µL contendo de 30-60 ng/ µl de DNA, 125 µM de dNTPs (dATP, dGTP, dCTP e dTTP), Tampão 10x, 0,2 µM de cada primer, 2,0 µM de MgCl₂ e 1,5 U da enzima Taq polimerase.

Para ITS procedeu-se da seguinte forma: 95°C por 5 minutos, 10 ciclos em touchdown de 95°C por 45 segundos, 60°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos. Em seguida, 32 ciclos de 95° por 45 segundos, 58°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos e uma extensão final de 72°C por 5 minutos.

Para o gene COI realizou-se a PCR com desnaturação inicial de 95°C por 3 minutos, 25 ciclos de 95°C por 1 minuto, 54°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e 30 segundos. Por fim, uma extensão final de 72° por 7 minutos.

Para 16S a reação foi realizada com desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos, 10 ciclos de 94°C por 45 segundos, 64°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos, seguido de 25 ciclos de 94°C por 45 segundos, 54°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos. Por fim, uma extensão final de 72° por 7 minutos.

O amplificado foi verificado por eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio, sendo posteriormente purificados por método enzimático com o PCR Product Pre-sequencing Kit (Amersham) conforme instruções do fabricante. A leitura das sequências foi realizada em Sequenciador Automático em empresa especializada.

A Tabela 1 mostra as espécies encontradas por localidade e as sequências obtidas para cada marcador.

Localidade	Espécie	Marcador			Espécie	Marcador		
		molecular (n)				molecular (n)		
		COI	16S	ITS		COI	16S	ITS
São Luís, MA	<i>B. glabrata</i>	(8)	(5)	-	<i>B. straminea</i>	(22)	(4)	(10)
São Bento, MA	<i>B. glabrata</i>	(8)	(6)	(6)	<i>B. straminea</i>	(1)	(1)	(26)
Arari, MA	-	-	-	-	<i>B. straminea</i>	(2)	(2)	-
Pedreiras, MA	-	-	-	-	<i>B. straminea</i>	-	(2)	-
Trizidela do Vale, MA	-	-	-	-	<i>B. straminea</i>	(1)	-	-
Caxias, MA	-	-	-	-	<i>B. straminea</i>	(15)	(4)	(4)
Carolina, MA	-	-	-	-	<i>B. straminea</i>	(2)	(2)	-
TOTAL	<i>B. glabrata:</i>	(16)	(11)	(6)	<i>B. straminea:</i>	(43)	(15)	(40)

Tabela 1. Espécies encontradas por localidade e sequências obtidas para cada marcador. N^o, número de sequências. Fonte: O Autor.

Análise dos Dados – As sequências de DNA obtidas foram visualmente verificadas e manualmente corrigidas no programa MEGA 6.0 (TAMURA *et al.*, 2013) e alinhadas através da ferramenta CLUSTAW/MEGA 6.0 (TAMURA *et al.*, 2013). Ainda nesse programa foi avaliado o melhor modelo evolutivo e construídas as árvores filogenéticas através de Máxima Verossimilhança.

Para essa análise, utilizou-se também 23 sequências de espécies do gênero *Biomphalaria* depositadas no NCBI Genbank e no BOLD Systems. Como grupo externo foi utilizada sequência do planorbídeo *Bulinus truncatus* Audouin, 1826. O modelo evolutivo utilizado foi Tamura-3-parâmetros (T92 + G + I) com intervalo de confiança de 95% e 1000 replicações.

Índices de diversidade foram calculados através do Programa DNA sp v.5 (LIBRADO & ROZAS, 2009). As redes de haplótipos foram construídas através do método de vetores medianos no Network 4.6.1.0 (<http://www.fluxus-engineering.com>).

O cálculo da Percentagem de Variância Molecular (AMOVA) foi realizado no Programa GenAIEx (PEAKALL e SMOUSE, 2012) e o Índice de Saturação das sequências foi calculado do DAMBE (Xia, 2013).

Optou-se nesta pesquisa pelos marcadores ITS e 16S devido aos vários trabalhos que os utilizaram (DEJONG et al, 2001; DEJONG et al, 2003; ESTRADA et al, 2005; JORGENSEN et al, 2007; PLAM et al, 2007).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR

A maior parte do material coletado foi incluída na Coleção da Fauna Maranhense (COFAUMA), enriquecendo o acervo de tecidos e conchas. Os espécimes foram identificados morfológicamente como *B. straminea* e *B. glabrata*. As Figura 4 e 5 apresentam, respectivamente, as conchas e a morfologia interna de *B. glabrata* e *B. straminea*.

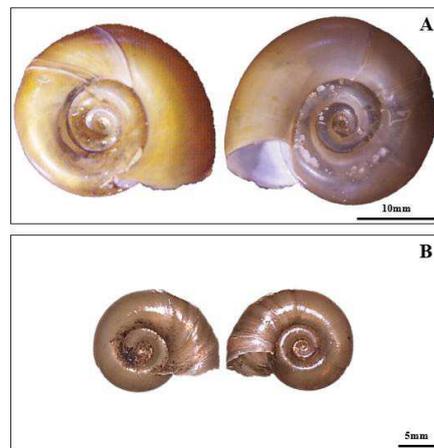


Figura 4. Concha de *B. glabrata* (A) e concha de *B. straminea* (B). Fonte: O Autor e Cantanhede (2014).

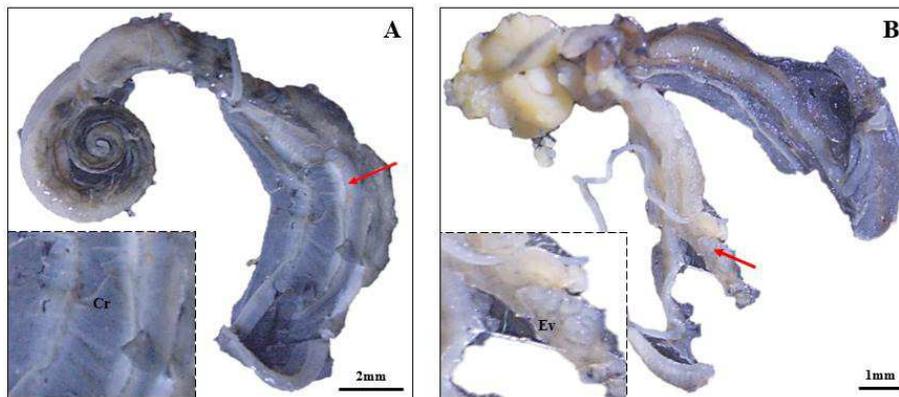


Figura 5. Morfologia interna de *B. glabrata* (A) destacando a crista renal (Cr) e, morfologia interna de *B. straminea* (B) com ênfase no enrugamento vaginal (Ev). Fonte: O Autor.

Indivíduos adultos de *B. glabrata* possuem concha grande (30 a 40mm) com seis ou sete giros. A massa visceral apresenta crista sobre a superfície renal e no útero, uma dilatação em forma de bolsa (PARAENSE, 1975). A concha de *B. straminea* é pequena (10 a 12 mm), com aproximadamente quatro giros com o último dilatado e ambas as faces profundamente umbilicadas. O aparelho genital caracteriza-se por um enrugamento vagina (PESSÔA; MARTINS, 1982).

A identificação molecular a partir da PCR-RFLP com a enzima *DdeI* da região ITS (Fig. 6), permitiu confirmar os dados morfológicos de *B. glabrata* e *B. straminea* no presente trabalho, apresentando semelhanças com os perfis de restrição obtidos por Caldeira et al (2000) (Fig. 3). A Figura 6 apresenta perfis de restrição para espécimes de *B. straminea* e *B. glabrata*, obtidos neste trabalho.

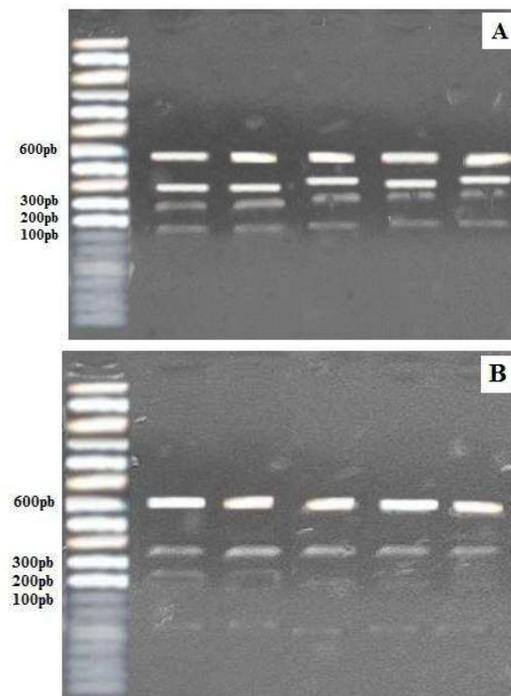


Figura 6. Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio mostrando perfis de restrição de *B. straminea* (A) e *B. glabrata* (B). O peso molecular está descrito à esquerda das imagens. Fonte: Ferreira (2015).

A identificação molecular das espécies do gênero *Biomphalaria* a partir de perfis de restrição por PCR-RFLP tem sido largamente utilizada (VIDIGAL et al, 1998; VIDIGAL et al, 2000; CARVALHO et al, 2001; VIDIGAL et al, 2001; VIDIGAL et al, 2002; VELÁSQUEZ, 2002; CALDEIRA et al, 2004; VIDIGAL et al, 2004), por ser uma técnica que apresenta resultados satisfatórios. Tais resultados são essenciais para o controle da esquistossomose, já que as espécies vetores não se relacionam da mesma maneira quanto a transmissão, apresentando taxas de suscetibilidade variadas (CAMPBELL et al, 2000). Para o Estado do Maranhão, onde a identificação de *B. glabrata* e *B. straminea* baseava-se somente em dados morfológicos (CARVALHO et al, 2007; DORLAM'S et al, 2013; CANTANHEDE et al, 2014), confirma-se por essa técnica a presença dessas duas espécies, responsáveis pela transmissão da doença (BARBOSA et al, 2000; VIDIGAL et al, 2000; GIOVANELLI et al, 2001; TEODORO, 2009; DORLAM'S et al, 2013).

É relevante destacar que estes são os primeiros registros de *B. straminea* nas cidades de: Pedreiras, Trizidela do Vale, Caxias e Carolina, todas localizadas na região de Cerrado. Não verificou-se *B. glabrata* nessas cidades. Supõe-se assim que, a grande amplitude geográfica colonizada por *B. straminea* no Maranhão, caracterize sua plasticidade e capacidade adaptativa (BARBOSA, 1987; TELES, 2005), conquanto mais investigações sejam importantes, já que há registro de *B. glabrata* para o Cerrado Maranhense (CARVALHO et al, 2007), havendo possibilidade de novos sítios de ocorrência.

DIVERSIDADE GENÉTICA

Gene COI – As sequências obtidas foram de 611 pares de bases para as duas espécies. Para *B. glabrata* observou-se 12 sítios variáveis e 11 sítios informativos para

parcimônia. As sequências (16 amostras) foram agrupadas em 4 haplótipos, com diversidade nucleotídica (π) de 0,00781 e diversidade haplotípica (Hd) de 0,692. Para *B. straminea*, foram encontrados 66 sítios variáveis e 32 informativos para parcimônia. Foram identificados 12 haplótipos (43 amostras), diversidade nucleotídica (π) de 0,01305 e diversidade haplotípica (Hd) de 0,886. A frequência média das bases para *B. glabrata* foi: T = 25,0%, C = 18,2%, A = 44,2 G = 12,6%. Para *B. straminea*, T = 25,7%, C = 17,5%, A = 43,4%, G = 13,4%.

Gene 16S – As sequências continham 305 pares de bases para ambas as espécies. Em *B. glabrata* ocorreram 16 sítios variáveis e 2 sítios informativos para parcimônia. As sequências foram agrupadas em 3 haplótipos (11 amostras), com diversidade nucleotídica (π) de 0,01078 e diversidade haplotípica (Hd) de 0,618. Para *B. straminea*, 25 sítios variáveis e 11 informativos para parcimônia. Verificou-se a ocorrência de 7 haplótipos (15 amostras), diversidade nucleotídica (π) de 0,00842 e diversidade haplotípica (Hd) de 0,572. A composição nucleotídica média das sequências de *B. glabrata* foi: T = 36,3%, C = 17,6%, A = 34,6%, G = 11,4%. Para *B. straminea*, T = 35,9%, C = 18,5%, A = 34,5%, G = 11,0%.

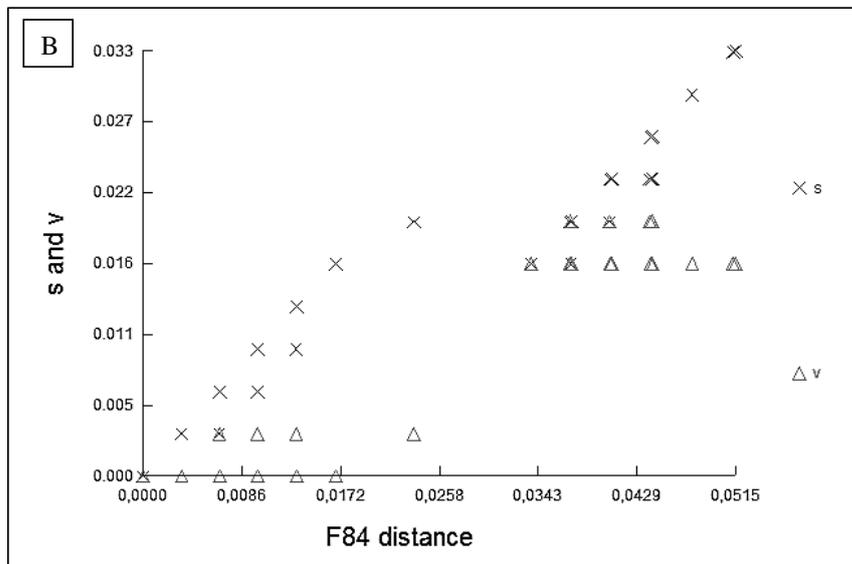
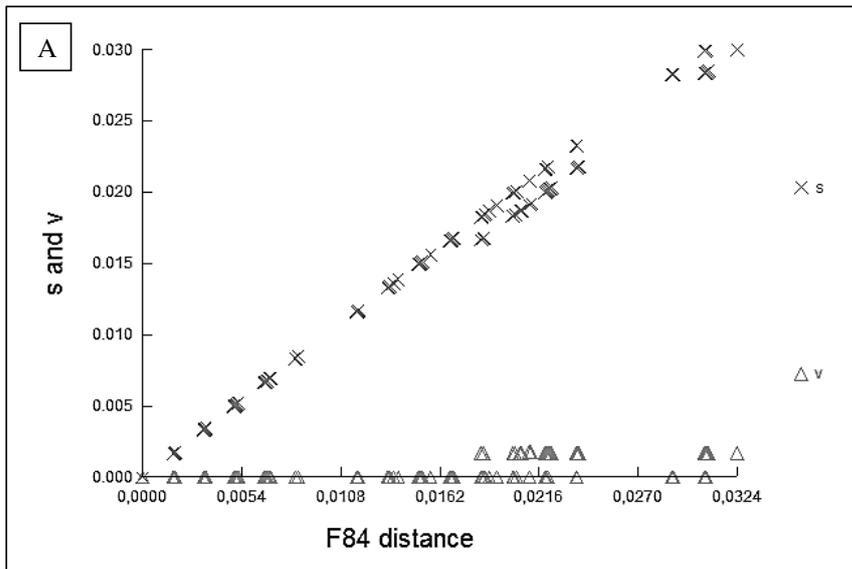
Região ITS – As sequências obtidas apresentaram 466 pares de bases. Para *B. glabrata* 54 sítios variáveis, porém nenhum sítio informativo para parcimônia. As sequências foram agrupadas em 3 haplótipos (6 amostras), com diversidade nucleotídica (π) de 0,04787 e diversidade haplotípica (Hd) de 0,600. Para *B. straminea*, 75 sítios variáveis e 61 informativos para parcimônia. Foram encontrados 16 haplótipos (40 amostras), diversidade nucleotídica (π) de 0,03296 e diversidade haplotípica (Hd) de 0,891. A frequência média das bases para *B. glabrata* foi: T = 17,1 %, C = 29,9%, A = 26,3 G = 26,7%. Para *B. straminea*, T = 17,4%, C = 29,7%, A = 26,0%, G = 26,8%.

Collado et al (2011; 2014), descreveram composições concordantes para o gene COI em *Biomphalaria* sp, quando considerados em conjuntos os nucleotídeos A+T e G+C. Essas percentagens nucleotídicas agrupadas também se assemelham à descrita para planorbídeos *Helisoma* sp. (CORREIA, 2011), sugerindo que esses dados são comuns em moluscos da Família Planorbidae.

Além dessas, outras pesquisas com *Biomphalaria* demonstram os mesmos resultados, nos genes 16S (DEJONG et al, 2001; JORGENSEN et al, 2007; PLAM et al, 2007) e COI (PLAM et al, 2007; JORGENSEN et al, 2007).

Quando compara-se o índice de diversidade nucleotídica (π) de COI, Collado et al (2014) apresenta, para *Biomphalaria* sp., valor menor (0.00332) que os descritos no presente trabalho. Para a região ITS, os valores de diversidade nucleotídica relatados por Estrada et al (2005) para as espécies: *B. temascalensis* Rangel-Ruiz, 1987 (0.01903), *B. tenagophila* e *B. occidentalis* (0.03282), *B. amazonica* (0.02523), *B. kuhniana* e *B. straminea* (0.01475), *B. prona* e *B. edisoni* (0.0473) também são menores que os apresentados aqui. Por sua vez, como a diversidade nucleotídica implica em diversidade haplotípica (FREITAS et al, 2009), supõem-se a existência, nas populações maranhenses, de considerável nível de diversificação do gênero.

A alta saturação de ITS inviabilizou suas análises. Apesar de apresentar certo nível de saturação, 16S foi incluso. O gene COI entretanto, mostrou-se bem aplicável (Figura 7).



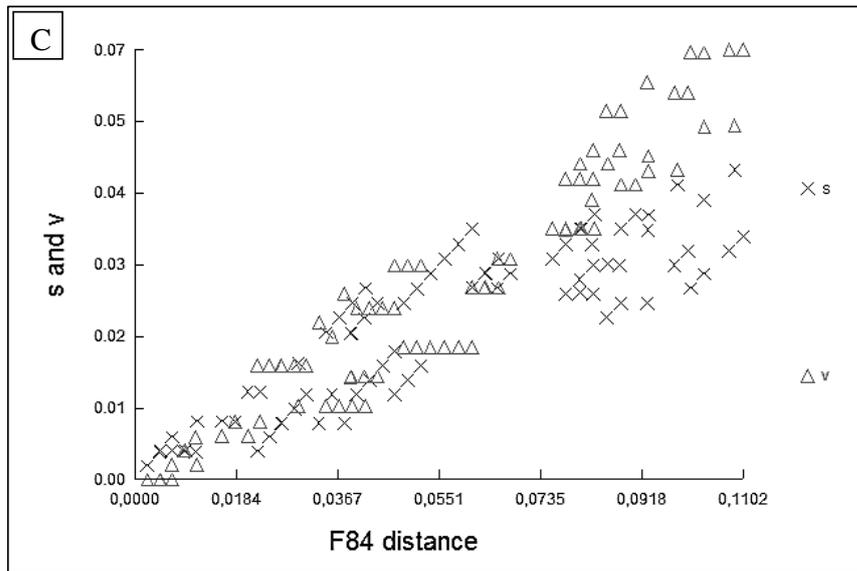


Figura 7. Níveis de saturação dos marcadores moleculares (A) COI (611pb), (B) 16S (305pb) e (C) ITS (466pb) calculados no programa DAMBE.

ANÁLISES FILOGENÉTICAS

A árvore filogenética apresentada na Figura 8 foi construída com 8 sequências do gene COI, obtidas neste trabalho; e com 12 sequências de COI disponíveis no BOLD Systems. O tamanho das sequências foi de 555 pares de bases. Os valores de bootstrap foram, na maioria, robustos, validando as relações filogenéticas apresentadas.

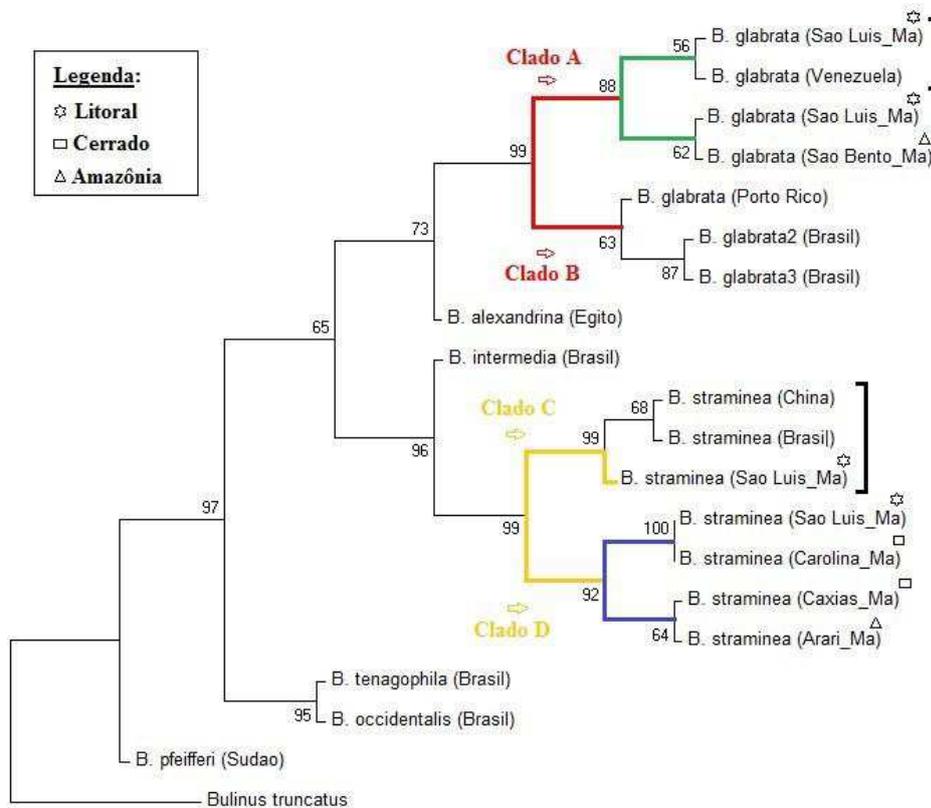


Figura 8. Árvore filogenética do gene COI construída no programa MEGA 6.0 através de Máxima Verossimilhança, pelo modelo Tamura-3-parâmetros (G + I) com intervalo de confiança de 95% e 1000 replicações. Fonte: O Autor.

A topologia da árvore revela que as populações de *B. glabrata* da Amazônia e Litoral Maranhense são mais aparentadas das populações da Venezuela que a populações brasileiras. De fato, observa-se que as populações do Brasil são mais próximas filogeneticamente às populações de outros países (Venezuela e Porto Rico) que entre si.

A filogenia apresentada na Figura 9 foi construída com 11 sequências do gene 16S, obtidas neste trabalho; e com 10 sequências de 16S disponíveis no Genbank. Os valores de bootstrap foram, na maioria, robustos, validando as relações filogenéticas apresentadas.

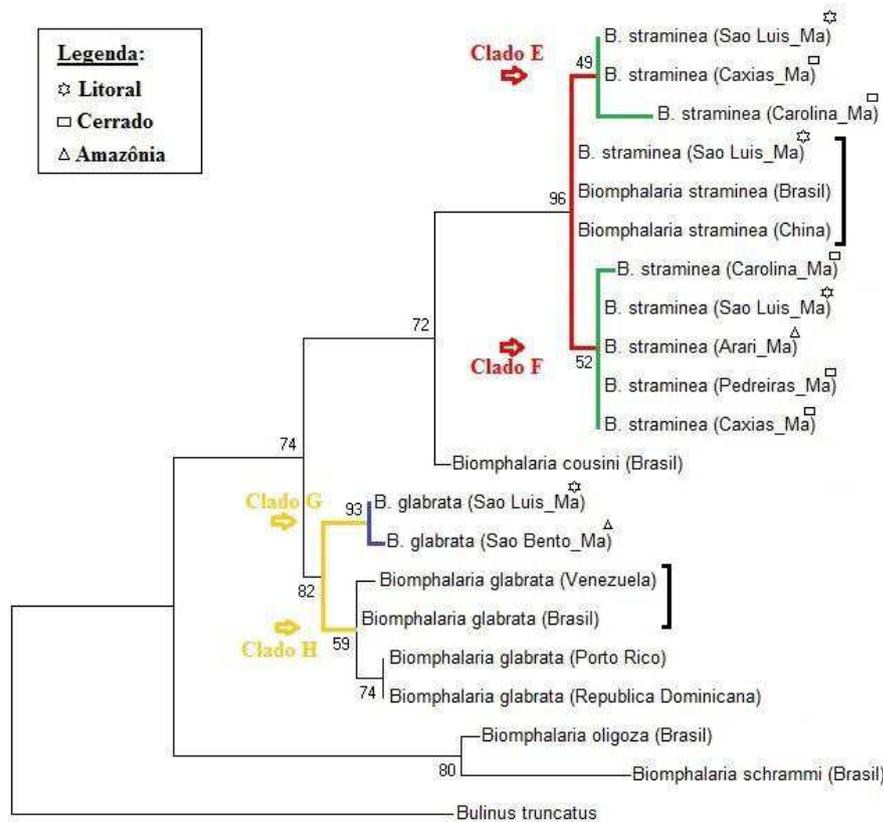


Figura 9. Árvore filogenética do gene 16S construída no programa MEGA 6.0 através de Máxima Verossimilhança, pelo modelo Tamura-3-parâmetros (G + I) com intervalo de confiança de 95% e 1000 replicações. Fonte: O Autor.

Diferente da árvore anterior, a topologia mostra que não há agrupamento entre as populações de *B. glabrata* da Amazônia e Litoral Maranhenses com populações da Venezuela, entretanto, deve-se levar em consideração que o tamanho reduzido das sequências possivelmente ocultou a existência dessa relação (a árvore de 16s pode estar mal resolvida devido a menor taxa evolutiva). Apesar disso, as duas filogenias demonstram haver relações próximas entre populações brasileiras e venezuelanas (e também proximidade com populações da América Central).

Configuração semelhante a essas foi apresentada por Dejong et al (2003) com diferentes marcadores moleculares (16S, ITS-1 e ND1). Neste trabalho, haplótipos brasileiros de *B. glabrata* (inclusive do Maranhão) agrupam-se com haplótipos da Venezuela, América Central e Ilhas do Caribe, de maneira que a proposta apresentada por Mavárez et al (2002) de que a bacia do Rio Amazonas funcionaria como barreira ao fluxo gênico entre as populações deste caramujo ao norte e ao sul da mesma, torna-se ainda menos sustentada com base no que aqui expõe-se.

As árvores apresentam haplótipos de *B. straminea* do Litoral do Maranhão (município de São Luís) proximamente relacionados a haplótipos da China. Assim, há indicativos de que populações maranhenses tenham contribuído com o fundo genético de *B. straminea* “exportado” para Hong Kong no início dos anos 1970, provavelmente pelo comércio de aquários e que foi documentado Meier-Brook, 1974. Ressalta-se que a Ilha de São Luís é região portuária internacional, possuindo o segundo maior complexo portuário em movimentação de carga do país. A literatura relata ainda, que *B. straminea* já foi encontrada em um aeroporto de Sidney sendo transportado entre peixes (WALKER, 1978).

As filogenias de COI e 16S revelam dois clados com valores de bootstrap moderados (em alguns casos) para *B. glabrata*, separando populações do Maranhão de outras populações do Brasil (Clados: A, B, G e H) A filogenia de Dejong et al (2003), também revela esse padrão, ocorrendo ainda, divergência mais recente nos clados maranhenses.

Para *B. straminea*, as filogenias apresentam linhagens bem suportadas (Clados: C, D, E e F), principalmente em COI, com distribuição sobreposta nos biomas (isso também fica claro para *B. glabrata* em COI).

Algumas relações apresentadas foram verificadas em pesquisas anteriores. Na filogenia de COI, as espécies *B. tenagophila* e *B. occidentalis* estão agrupadas (CAMPBELL et al, 2000; ESTRADA et al, 2005; COLLADO et al, 2011), ressaltando-se que estas compõem o complexo *B. tenagophila* (*B. tenagophila*, *B. t. guaibensis* e *B. occidentalis*) (CARVALHO et al, 2007).

A mesma árvore apresenta *B. intermedia* e *B. straminea* no mesmo ramo (DEJONG et al, 2001), sendo que elas estão agrupadas morfologicamente no complexo *B. straminea* (*B. straminea*, *B. intermedia* e *B. kuhniiana*) (CARVALHO et al, 2007).

A espécie *B. glabrata* agrupa-se com a espécie africana *B. alexandrina* (DEJONG et al, 2001; MORGAN et al, 2002; PLAM et al, 2007; COLLADO et al, 2011), reforçando sua correlação mais próxima com as espécies do Velho Mundo (CAMPBELL et al, 2000; DEJONG et al, 2001).

REDES HAPLOTÍPICAS

As redes de haplótipos construídas para as sequências dos genes COI e 16S de *B. glabrata* (Figura 10) indicaram haplótipos exclusivos para o Litoral e Amazônia maranhenses (não foram obtidas amostras desta espécie para o cerrado).

O número de passos mutacionais entre os haplótipos do Litoral é maior que entre os haplótipos da Amazônia, sendo evidentes para o gene COI. Além disso, são poucas as mutações separando as populações de cada bioma, em ambos os marcadores. Estes apontamentos sugerem que o estabelecimento de *B. glabrata* na Amazônia é recente.

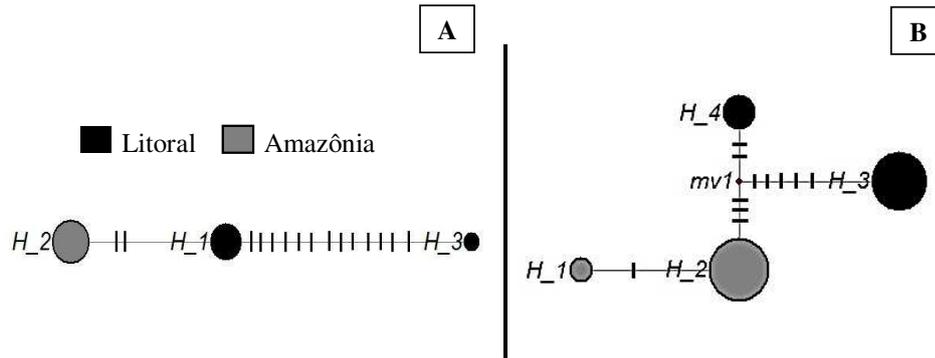


Figura 10. Redes de haplótipos dos genes COI (A) e 16S (B) de *B. glabrata* construídas no NETWORK através do cálculo de vetores medianos (“median joining”). Fonte: O Autor.

A rede haplotípica destes genes construída para *B. straminea* (Figura 11) apresentou haplótipos exclusivos e compartilhados para o Litoral, Amazônia e Cerrado, isto fica evidente em ambos os marcadores. Nota-se que a diversidade de haplótipos é maior no Litoral e Cerrado e reduzida na região da Amazônia maranhense, porém, para 16S este bioma apresenta haplótipos bastante diferenciados (H_2 e H_5). Ademais, apesar de genes bastante diferenciados nos biomas, há indicação de fluxo gênico entre populações do Litoral e Cerrado, sendo que, para os dois genes, há compartilhamento de haplótipos entre ambos os biomas.

Na análise de 16S observa-se o suposto haplótipo central (ancestral) mais frequente, o que naturalmente espera-se e, presente em todos os biomas. Em COI, o haplótipo central é percebido da mesma maneira, exceto por não ser o mais frequente, possivelmente devido a quantidade amostral insuficiente.

Por apresentarem desenvolvimento direto e vagilidade limitada, deveria ocorrer ausência de fluxo gênico e maior divergência genética entre as populações de cada bioma (COLLADO et al, 2011), especialmente as localizadas em pontos muito distantes (pontos A e G, Fig. 2). Entretanto, o oposto foi observado. A ausência de isolamento entre biomas foi confirmada pelo teste de Variância Molecular (AMOVA) que revelou ser maior a diversidade genética dentro das populações dos mesmos biomas que entre populações de biomas distintos, para ambas as espécies (Fig. 12).

Três possibilidades podem ser sugeridas para explicar este fluxo de genes, todas, levando em consideração transporte passivo dos caramujos: (1) transporte por outros organismos (VAN LEEUWEN et al 2012; VAN LEEUWEN et al, 2013), (2) ação antrópica (CORRÊA et al, 1970; CORRÊA et al, 1980; FERRARI E HOLFMANN, 1992) e (3) transporte fluvial (COLLADO et al, 2014).

Em defesa de (1), há registros sugerindo aves como potenciais dispersores de pequenos invertebrados (BILTON et al, 2001; GREEN e FIGUEROLA, 2005), transportando ovos aderidos à plumagem ou pés (FIGUEROLA e GREEN, 2002) e, indivíduos adultos no intestino, inclusive moluscos (VAN LEEUWEN et al 2012).

A atividade humana (2) é aspecto a ser considerado para explicar a diversidade genética em grande escala geográfica (MEIER-BROOK, 1974; MEUNIER et al, 2001; MAVÁREZ et al, 2002), tendo sido registrada sua forte influência na distribuição atual de moluscos dulcícolas, em geral, associada à prática da piscicultura (CORRÊA et al, 1970; FERRARI E HOLFMANN, 1992) e ao comércio de plantas aquáticas ornamentais (CORRÊA et al, 1980; MEIER-BROOK, 1974). A prática da agricultura já foi considerada como causa, não da introdução, mas da manutenção de caramujos, pela criação de habitats artificiais (MAVÁREZ et al, 2002).

Poder-se-ia pensar na possibilidade de (3) ocorrer pelo transporte em embarcações navegando em direção ao Porto do Itaqui (município de São Luís) por seus acessos fluviais, os rios Pindaré, Mearim e Grajaú. Todavia, estes moluscos provavelmente não sobreviveriam à salinidade da região estuarina (BARBOSA et al, 2001). Em seu trabalho, Barbosa et al (2001) coletaram espécimes de *B. glabrata* em área urbana do litoral de Pernambuco, porém no estuário do Rio Ipojuca, que desagua na região, nenhum exemplar do gênero foi encontrado. Brown (1994), afirma que apesar do gênero ser tolerante a uma série de variáveis físico-químicas, a salinidade é fator importante na prevenção da transmissão da esquistossomose.

Entretanto, a hipótese de transporte fluvial não é totalmente improvável, pois há possibilidade de transporte pelo fluxo de água e migração de uma para outra bacia em eventos de inundação (COLLADO et al, 2014). Os rios Pindaré, Mearim e Grajaú são, inclusive, naturalmente ligados (IBGE, 1997). De fato, segundo afirma Collado et al (2011), o gênero *Biomphalaria* é considerado excelente modelo para estudos biogeográficos e dispersão passiva.

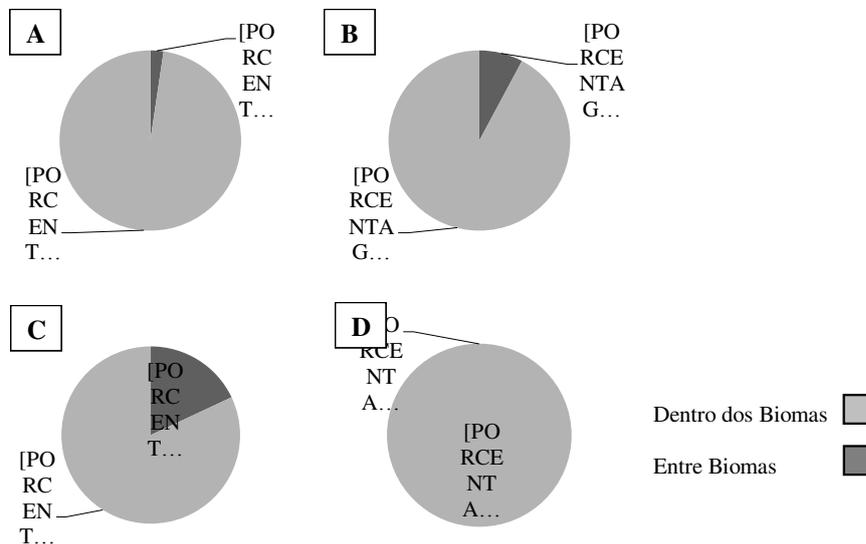


Figura 12. Percentagens de Variância Molecular: (A) 16S e (B) COI em *B. straminea*; (C) 16S e (D) COI em *B. glabrata*. Fonte: O Autor.

As informações alcançadas pela presente pesquisa são de relevância em planos de controle da esquistossomose, não exclusivamente no Estado do Maranhão. Os dados de diversidade genética populacional e fluxo gênico apresentados, demonstram que o potencial dispersivo destes organismos não pode ser subestimado. Representantes de populações geneticamente suscetíveis a linhagens de *S. mansoni* podem colonizar novas áreas próximas ou não de seu ponto de origem. Além disso, é possível que esse comportamento não seja atípico entre as espécies de moluscos dulcícolas, e que seus habitats, altamente fragmentados, e sua capacidade locomotora restritiva, não sejam barreiras tão eficientes a eventos migratórios.

CONCLUSÕES

- Para o Estado do Maranhão, onde a ocorrência de *B. glabrata* e *B. straminea* baseava-se somente em dados morfológicos, confirma-se através da identificação molecular por PCR-RFLP a presença das duas espécies. Os perfis espécie-específicos obtidos apresentam semelhanças com os perfis de restrição propostos por Caldeira et al (2000) e endossam a eficiência da técnica;
- Destaca-se a presença de *B. straminea* em cidades do Estado ainda não documentadas: Pedreiras, Trizidela do Vale, Caxias e Carolina, localizadas na região de Cerrado e a ausência de *B. glabrata* nestas cidades, conquanto mais investigações sejam importantes, já que há registro de *B. glabrata* para o Cerrado Maranhense;
- Para *B. straminea*, estes dois marcadores revelaram haplótipos exclusivos e compartilhados para o Litoral, Amazônia e Cerrado. Apesar de genes bastante diferenciados nos biomas, há indicação de fluxo gênico entre populações do Litoral e Cerrado;
- As informações obtidas na presente pesquisa podem ser usadas em planos de controle da esquistossomose, não apenas no Estado do Maranhão. Os dados de diversidade genética populacional e fluxo gênico demonstram que o potencial dispersivo destes organismos não pode ser subestimado;
- Por fim, é possível que esse comportamento não seja atípico entre as espécies de moluscos dulcícolas. Seus habitats, altamente fragmentados, e sua capacidade locomotora limitada, podem não ser barreiras tão eficientes ao fluxo genético.

REFERÊNCIAS

AVISE, J. C. **Phylogeography: The History and Formation of Species**. Cambridge: Harvard University Press. 2000. 447p

AVISE, J. C.; ARNOLD, J.; BALL JR., R. M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J. E.; REEB, C. A.; SAUNDERS, N. C. **Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics**. *Annu Rev Eco Syst*, v. 18, p 489-522, 1987.

BARBOSA, F. S. Competitive displacement of *Biomphalaria glabrata* by *Biomphalaria straminea*. *Mem Inst Oswal Cruz*. v. 82, p. 139-41, 1987.

BILTON, D. T.; FREELAND, J. R.; OKAMURA, B. Dispersal in freshwater invertebrates. *Annu Rev Ecol Syst* 32: 159–81, 2001.

BROWN, D. S. **Distribution and abundance of snails, brackish water: prevalence of infected snails spatial variation**. In: BROWN, D. S (Org.). *Fresh snails Afri medic import*, p. 317–318, 1994.

CALDEIRA, R. L.; VIDIGAL, T.; PAULINELLI S. T.; SIMPSON, A. J. G.; CARVALHO, O. S. Molecular identification of similar species of the genus *Biomphalaria* (Mollusca: Planorbidae) determined by a polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism. *Mem Inst Oswal Cruz*. v. 93, p. 219-25, 1998.

CALDEIRA R. L.; VIDIGAL T. H. D. A.; MATINELLA L.; SIMPSON A. J. G.; CARVALHO, O. S. Identification of planorbids from Venezuela by polymerase chain reaction amplification and restriction fragment length polymorphism of ITS of the RNA ribosomal gene. *Mem Inst Oswal Cruz*, v. 95, p 171-177. 2000.

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

CANTANHEDE, S. P. D.; FERNANDEZ, M. A.; MATTOS, A. C. de; MONTRESOR, L. C.; SILVA-SOUZA, N.; THIENGO, S. C. Freshwater gastropods of the Baixada Maranhense Microregion, an endemic area for schistosomiasis in the State of Maranhão, Brazil: I - qualitative study. *Rev Soc Bras Med Trop*. v. 47, n. 1, p. 79-85, 2014.

CAMPBELL, G.; JONES, C. S.; LOCKYER A. E.; HUGHES, S. BROWN, D.; NOBLE, L. R.; ROLLINSON, D. Molecular evidence supports an African affinity of the Neotropical freshwater gastropod, *Biomphalaria glabrata*, Say 1818, an intermediate host for *Schistosoma mansoni*. *Proc R Soc Lond B*, v. 267, p 2351-2358, 2000.

CHENG, H. L.; XIA D. Q.; WU T. T.; MENG X. P.; JI H. J.; DONG Z. G. Study on sequences of ribosomal DNA internal transcribed spacers of clams belonging to the Veneridae family (Mollusca: Bivalvia). *Act Gen Sin*, v. 33, n. 8, p 702–710, 2006.

CHITSULO, L.; ENGELS, D.; MONTRESOR, A.; SAVIOLI, L. The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Trop* v. **77**, p. 41–51, 2000.

COLEMAN, A. W.; VACQUIER, V. D. **Exploring the phylogenetic utility of ITS sequences for animals:** a test case for abalone (*Haliotis*). *Jour Mol Evol*, v. 54, p 246-257, 2002.

CARVALHO, O. dos S.; JANNOTTI-PASSOS, L. K.; CALDEIRA, R. L. Técnicas moleculares. In: AMARAL, R. S. do; THIENGO, S. C.; PIERI, O. S. (Org.). *Vigilância e Controle de Moluscos de Importância Epidemiológica*. Brasília: Ministério da Saúde, 2008. p. 81-84.

CARVALHO, O. dos S.; SCHOLTE, R. G. C.; AMARAL, R. S. do. Distribuição dos moluscos hospedeiros intermediários de *Schistosoma mansoni* no Brasil, *Biomphalaria glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila*. In: AMARAL, R. S. do; THIENGO, S. C.; PIERI, O. S. (Org.). *Vigilância e Controle de Moluscos de Importância Epidemiológica*. Brasília: Ministério da Saúde, 2008. p. 111-126.

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

CARVALHO, O. S.; JANNOTTI-PASSOS, L. K.; CALDEIRA, R. L. Importância epidemiológica e biologia molecular aplicada ao estudo dos moluscos do gênero *Biomphalaria*. In: Carvalho, O. S.; Coelho, P. M. Z.; Lenzi, H. L. *Schistosoma*

mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2008. p. 311-345.

DEJONG, R. J.; MORGAN, J. A. T.; PARAENSE, W. L.; POINTIER, J-P.; AMARISTA M.; AYEK-KUMI, P. F. K et al. Evolutionary relationships and biogeography of *Biomphalaria* (Gastropoda: Planorbidae) with implications regarding its role as host of the human bloodfluke, *Schistosoma mansoni*. *Mol Bio Evol*, v. 18, p. 2225–2239, 2001.

DEJONG, R. J.; MORGAN, J. A. T.; WILSON, W. D.; AL-JASER, M. H.; APPLETON, C. C.; COULIBALY, G. Phylogeography of *Biomphalaria glabrata* and *B. pfeifferi*, important intermediate hosts of *Schistosoma mansoni* in the New and Old World tropics. *Mol Eco*, v.12, p. 3041–3056, 2003.

FIGUEROLA, J; GREEN, A. J. How frequent is external transport of seeds and invertebrate eggs by waterbirds? A study in Donana, SW Spain. *Arch Hydro*, n 155, p 557–65, 2002.

FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEH, W.; LUTZ, R. VRIJENHOEK, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Bio Biotech*, v. 3, p. 294–299, 2002.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Fundamentos de Genética da Conservação**. Sociedade Brasileira de Genética: Editora SBG, 2008. 262 p.

HUANG, J.; HAO, L.; LIU, S.; Li, L.;Zhang W X, Dai Z H. Phylogenetic position of Chinese endemic *Drosophila curviceps* species subgroup in the *Drosophila immigrans* groups. *Act Gen Sin*, v. 29, n. 5, p 417-423, 2002.

KANE, R. A.; ROLLINSON, D. Repetitive sequences in the ribosomal DNA . internal transcribed spacer of *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma intercalatum* and *Schistosoma mattheii*. *Mol Bio Parasitol*, v. 63, p 153-156, 1994.

KAWAZOE, U.; MAGALHÃES, L.; HOTTA, L. K.; TAKAKU, L. Competição biológica entre *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) e *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835), em criadouros naturais no município de Ourinhos, SP, (Brasil). *Rev Saúde Pub*, v. 14, n 1, p 65-87, 1980.

KLOOS, H.; JANOTTI PASSOS, L. K.; LOVERDE, P.; OLIVEIRA, R. C.; GAZZINELLI, A. Distribution and *Schistosoma mansoni* Infection of *Biomphalaria glabrata* in Different Habitats in a Rural Area in the Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil: Environmental and Epidemiological Aspects. *Mem Inst Oswal Cruz*, v. 99, n. 7, p 673-681, 2004.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. **DnaSP v5**: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinform*, v. 25, p 1451–1452, 2009.

LIMA, L. C. *Biomphalaria* aff. *glabrata* do pleistoceno de Janaúba, Minas Gerais. *Mem Inst Oswal Cruz*, v. 79, p 55-58, 1984.

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

MEDRANO, J. F.; AESEN, E.; SHARROW, L. DNA Extraction from Nucleated Red Blood Cells. *Biotech*, v. 8, p. 43, 1990.

MEIER-BROOK C. A snail intermediate host of *Schistosoma mansoni* introduced into Hong Kong. *Bull WHO*, v. 51, p. 661, 1974.

PARAENSE, W. L. Self and cross-fertilization in *Australorbis glabratus*. *Mem do Inst Oswal Cruz*, v. 53, p. 285-291, 1955.

PARAENSE, W. L. Estado atual da sistemática dos planorbídeos brasileiros. *Arq Mus Nac Rio de Janeiro*, v. 55, p. 105-128, 1975.

PARAENSE, W. L. *Biomphalaria kuhniana* (Clessin, 1883), planorbid mollusc from South America. *Mem Inst Oswal Cruz*, v. 83, p. 1-12, 1988.

PARAENSE, W. L. Estado atual da sistemática dos planorbídeos brasileiros. *Arq Mus Nac Rio de Jan*, v. 55, p. 105-128, 1985.

SILVA, F. B. da. Filogeografia comparada e história evolutiva costeira sul e sudeste do Brasil. 2007. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

SOUZA, C. P. de; LIMA, L. C.; JANNOTTI-PASSOS, L. K.; FERREIRA, S. S. GUIMARÃES, C. T.; VIEIRA, I. B. de F.; JUNIOR, R. M. Moluscos límnicos da microrregião de Belo Horizonte, MG, com ênfase nos vetores de parasitoses. *Ver Soc Bra Med Trop*, v. 31, n. 5, p. 449-456, 1998.

TAMURA, K.; PERTERSON, D.; STECHER, G.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. **MEGA6**: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Bio Evol*, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

TCHAICKA, L. Abordagens filogenéticas, filogeográficas e populacionais em canídeos sul-americanos. 2006. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

TEODORO, T. M.; CALDEIRA, R. L. Investigação da ocorrência de *Biomphalaria cousini* no Brasil e sua suscetibilidade ao *Schistosoma mansoni*. 2009. Dissertação (Mestre em Ciências da Saúde), Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2009.

TEODORO, T. M.; JANOTTI-PASSOS, L. K.; CARVALHO, O.S.; CALDEIRA, R. L. Occurrence of *Biomphalaria cousini* (Mollusca: Gastropoda) in Brazil and its susceptibility to *Schistosoma mansoni* (Platyhelminths: Trematoda). *Mol Phylo Evol* 57: 144-151, 2010.

TELES, H. M. S. Distribuição de *Biomphalaria straminea* ao Sul da Região Neotropical. *Rev Saúde Púb*, v. 30, p 341-349, 1996.

TELES, H. M. S. Distribuição geográfica das espécies dos caramujos transmissores de *Schistosoma mansoni* no Estado de São Paulo. *Rev Soc Bra de Med Trop*, v. 38, n. 5, p 426-432, 2005.

TELES, H. M. S.; VAZ, J. F. Distribuição de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Pulmonata, Planorbidae) no Estado de São Paulo, Brasil. *Rev Saúde Púb*, v. 21, p 508-512, 1987.

TUAN, R. Diversity and distribution of the *Biomphalaria* species in the middle reaches of the Paranapanema River, São Paulo, SP, Brazil. *Biota Neotrop*, v. 9, n. 1, 2009.

VAN DER KNAAP, W. P. W.; LOKER, E. S. Immunemechanisms in trematode-snail interactions, *Parasitol Today*, v 6, n 6, p 175–182, 1990.

VELÁSQUEZ, L. E.; CALDEIRA R. L.; ESTRADA V. E.; CARVALHO, O. S. Morphological and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphis characterization of *Biomphalaria kuhniiana* and *Biomphalaria amazonica* from Colombia. *Mem Inst Oswal Cruz*, v. 97, p 997-1004, 2004.

VIDIGAL, T. H. D. A.; CALDEIRA R. L.; SIMPSON, A. J. G.; CARVALHO, O. S. Identification of *Biomphalaria havanensis* and *Biomphalaria obstructa* populations from Cuba using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism of the ribosomal RNA intergenic spacer. *Mem Inst Oswal Cruz*, v. 96, p 661-665, 2001.

VIDIGAL, T. H. D. A.; CALDEIRA, R. L.; SIMPSON, A. J. G.; CARVALHO, O. S. Further studies on the molecular systematics of *Biomphalaria* snails from Brazil. *Mem do Inst Oswal Cruz*. v. 95, p. 57–66, 2000.

VIDIGAL, T. H. D. A.; MONTRESOR, L. C.; SIMPSON, A. J. G.; CARVALHO, O. S. Polymerase Chain Reaction and Restriction Fragment Length Polymorphism of Cytocrome Oxidase Subunit I Used for Differentiation of Brazilian *Biomphalaria* Species Intermediate Host of *Schistosoma mansoni*. *Mem Inst Oswal Cruz*, v., p. 47-52, 2002.

VIDIGAL T. H. D. A.; SPATZ, L.; KISSINGER, J. C.; REDONDO, R. A. F.; PIRES, E. C. R.; Simpson, A. J. G.; Carvalho, O. S. Analysis of the First and Second Internal Transcribed Spacer Sequences of the Ribosomal DNA in *Biomphalaria tenagophila* Complex (Mollusca: Planorbidae). *Mem Inst Oswal Cruz*, v. 99, n. 2, p 153-158, 2004.

YUAN, C. C.; LI, P. X.; WANG, Y. F.; SHI, S. H. The confirmation of putative natural hybrid species *Meconopsis* × *Cookie* G. Taylor (Papaveraceae) based on nuclear ribosomal DNA ITS region sequence. *Act Gen Sin*, v. 31, n. 9, p 901-907, 2004. (in Chinese with an English abstract).